

**Über Bestimmungsmethoden für Adrenalin
und Noradrenalin und das Vorkommen von
Adrenalin und Noradrenalin
im menschlichen Blut und Urin**

Wolfgang Lermann



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555227_0059

AUS DEM PHYSIOLOGISCH-CHEMISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof.Dr.phil., Dr.med.h.c., Dr.med.vet.h.c.,
Dr.rer.nat.h.c., Dr.phil.h.c. A. BUTENANDT

ÜBER BESTIMMUNGSMETHODEN
FÜR ADRENALIN UND NORADRENALIN UND DAS
VORKOMMEN VON ADRENALIN UND NORADRENALIN
IM MENSCHLICHEN BLUT UND URIN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Lermann
aus
Chemnitz

München 1958



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med.Dr.ing.H. NIEMER
Mitberichterstatter: Prof.Dr.phil.,Dr.med.h.c.,Dr.med.vet.h.c.,
Dr.rer.nat.h.c.,Dr.phil.h.c.A. BUTENANDT
Dekan: Professor Dr. med.K. KOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 11.IX.1958

MEINEN LIEBEN ELTERN
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>EINLEITUNG</u>	
Entdeckung von Adrenalin und Noradrenalin	9
1. Chemische und physikalische Eigenschaften von Adrenalin und Noradrenalin	9
2. Entstehung von Adrenalin und Noradrenalin	11
3. Abbau von Adrenalin und Noradrenalin	12
4. Physiologie von Adrenalin und Noradrenalin	13
<u>BESTIMMUNGSMETHODEN FÜR ADRENALIN UND NORADRENALIN</u>	
Einteilung der Bestimmungsmethoden	16
A. Biologische Bestimmungsmethoden	
1. Methode nach v. Euler	17
2. Methode nach Hamilton/Litchfield/Peart/Sowry	18
Zusammenfassender Überblick	18
B. Kolorimetrische Bestimmungsmethoden	
1. Methode nach Whitehorn und Shaw	19
2. Methode nach James	21
3. Methode nach Heinrich/Schuler	22
4. Methode nach v. Euler/Hamberg	24
5. Methode nach James/Kilbey	25
6. Methode nach Salgó	26
7. Methode nach Reiss	28
Zusammenfassender Überblick	31

C. Papierchromatographische Bestimmungsmethoden

1. Methode nach James	34
2. Methode nach Goldenberg/Faber/Alston/Chargaff	35
3. Methode nach v. Euler/Hamberg	36
4. Methode nach James/Kilbey	37
5. Methode nach Glazko/Dill	38
6. Methode nach Shea	39
7. Methode nach Sheperd/West	39
8. Methode nach Wankmüller	40
9. Methode nach Pitkänen	40
10. Methode nach Hüter	41
Zusammenfassender Überblick	42

D. Fluorimetrische Bestimmungsmethoden

Fluoreszenzreaktion des Adrenalins	45
1. Methode nach Jørgensen	46
2. Methode nach Lehmann/Michaelis	47
3. Methode nach Annersten/Grönwall/Koiw	49
4. Methode nach Lund	53
5. Methode nach Weil-Malherbe/Bone	66
6. Methode nach Manger/Baldes/Flock/Bollmann/ Berkson/Jacobs	74
7. Methode nach v. Euler/Floding	76
Spezifität der Adreno- bzw. Noradrenolutinfluoreszenz	79
Zusammenfassender Überblick	81

ADRENALIN UND NORADRENALIN IM MENSCHLICHEN BLUT

1. Normaler Katechinamingehalt des venösen Blutes	86
2. Freies und gebundenes Adrenalin bzw. Noradrenalin im Blut	88
3. Arterio-venöse Differenz von Adrenalin und Noradrenalin	89
4. Adrenalin- und Noradrenalingehalt menschlicher Erythrozyten	90
5. Adrenalin- und Noradrenalingehalt menschlicher Thrombozyten	91
6. Adrenalingehalt des Blutes unter verschiedenen Bedingungen	92
7. Katechinamingehalt des Blutes bei Phaeochromozytomen	92
Zusammenfassender Überblick	93

ADRENALIN UND NORADRENALIN IM MENSCHLICHEN URIN

A.	Urinaufbereitungsmethoden	
	1. Methode nach v. Euler/Hellner	94
	2. Methode nach Goldenberg/Serlin/Edwards/Rapport	96
	3. Methode nach v. Euler/Orwén	97
B.	Katechinamin-Ausscheidung im Urin unter normalen Bedingungen	99
C.	Katechinamin-Ausscheidung im Urin unter verschiedenen Bedingungen	
	1. Infusion von Noradrenalin	102
	2. Muskelarbeit	103
	3. Insulin-Hypoglykämie	103
	4. Hypertension	103
	5. Adrenalektomie	105
	6. Endokrine Störungen	105
	7. Coronarthrombose	105
	8. Thalliumvergiftung	106
	9. Spezifisch-dynamische Wirkung des Eiweisses	106
	10. Stress-Zustände	106
	11. Myokardinfarkt	108
	12. Posturale Hypotonie	108
D.	Katechinamin-Ausscheidung im Urin bei Phaeochromozytomen	
I.	Diagnostische Methoden zum Phaeochromozytom-	
	Nachweis	108
	1. Methoden zur Anfallsauslösung	108
	2. Methoden zur Blockierung der Anfälle	110
	3. Röntgenologischer Nachweis der Tumoren	112
II.	Bestimmung der Katechinamin-Ausscheidung im Urin bei Phaeochromozytomen	112
F.	Zusammenfassender Überblick	119
	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	124
	Literaturverzeichnis	125

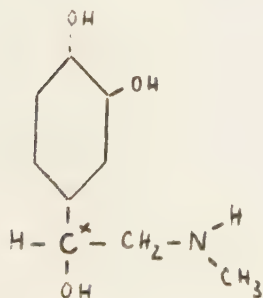
E I N L E I T U N G

Schon 1901 wurde Adrenalin als erstes Hormon in kristallisierter Form erhalten (TAKAMINE; ALDRICH; v. FÜRTH). Bald darauf gelang (FRIEDMANN) die Aufklärung der chemischen Konstitution des Adrenalins und 1903 (STOLZ) die chemische Synthese. Das Adrenalin wird im Nebennierenmark gebildet. Lange Zeit wurde das Noradrenalin nur als Vorläufer des Adrenalins angesehen. 1946/48 wurde jedoch das Noradrenalin als humoraler Überträgerstoff des sympathischen Nervensystems erkannt (v. EULER -1, 2, 3). Schliesslich wurde 1949 das Noradrenalin als zweites Hormon des Nebennierenmarkes entdeckt (BULBRING/BURN, 4; PEART, 5).

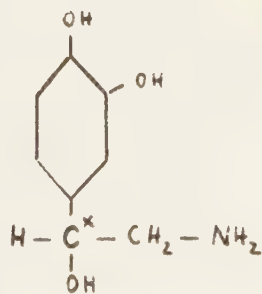
Adrenalin und Noradrenalin werden oft als Katechinamine bezeichnet. Wegen der Wichtigkeit der englischen Literatur seien die Synonyma angeführt: Adrenalin = epinephrine; Noradrenalin = norepinephrine = arterenol; Katechinamine = catechol amines.

1. Chemische und physikalische Eigenschaften von Adrenalin und Noradrenalin.

Adrenalin ist ein Methylamino-äthanol-brenzkatechin. Dem Noradrenalin fehlt nur die Methylgruppe des Adrenalins; es ist ein Amino-äthanol-brenzkatechin.



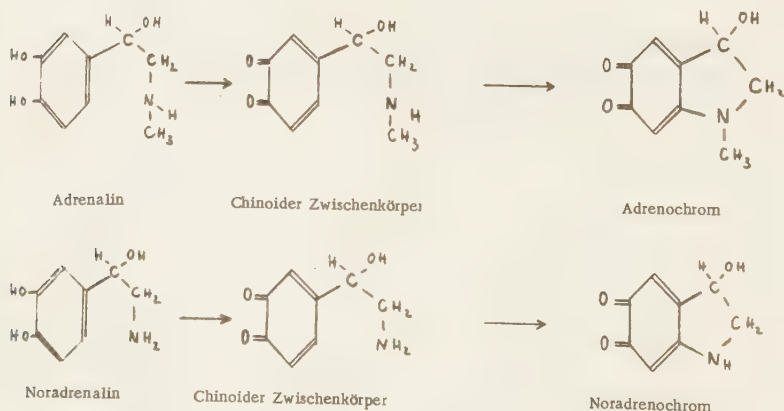
Adrenalin



Noradrenalin

Wegen des asymmetrischen C-Atoms kommt das Adrenalin in optisch aktiver Form und als Razemat vor. Das natürliche Adrenalin ist links-drehend. Durch Synthese wird das Razemat gewonnen. Das natürliche Produkt ist etwa 12-15 mal wirksamer als das synthetische.

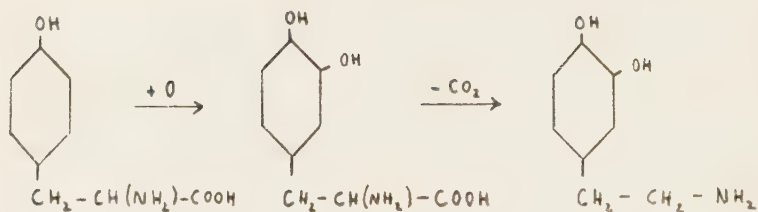
Adrenalin und Noradrenalin sind schlecht löslich in kaltem, besser in warmen Wasser. Dagegen lösen sich die Katechinamine leicht in verdünnten Säuren unter Bildung von Salzen. Wie alle Dioxyphenylderivate sind Adrenalin und Noradrenalin leicht oxydabel in Gegenwart von Sauerstoff, besonders bei alkalischer Reaktion, oder wenn Schwermetallionen zugegen sind. Noradrenalin ist jedoch in schwach saurem Milieu wesentlich oxydationsbeständiger als Adrenalin. Diese Eigenschaft des Noradrenalins ist für die therapeutische Verwendung der beiden Amine von Belang. Schon beim Stehen an der Luft werden Adrenalin und Noradrenalin oxydiert. Dabei entstehen ebenso wie bei der Oxydation mit anorganischen oder organischen Oxydationsmitteln -über das entsprechende Chinon- das Adrenochrom bzw. Noradrenochrom. Im Gewebe findet die Adrenochrombildung unter dem Einfluss der Tyrosinase, einer Phenol-oxydase statt. Schnelle Oxydation und Inaktivierung kann im Gewebe auch durch Aminoxydasen erfolgen. Vitamin C (1-Ascorbinsäure) verhindert diese oxydative Zerstörung und kann daher als Schutzstoff für die Katechinamine verwendet werden.



2. Entstehung von Adrenalin und Noradrenalin.

Adrenalin wird im Nebennierenmark gebildet. Noradrenalin wird als Überträgerstoff an den adrenergischen -das sind fast alle postganglionären, sympathischen- Nervenfasern frei. Zugleich konnte Noradrenalin als zweites Hormon des Nebennierenmarkes nachgewiesen werden. Im Nebennierenmark überwiegt das Adrenalin (80-90 %) quantitativ das Noradrenalin (20-10 %). Die Katechinamine werden vom Nebennierenmark an das Blut abgegeben. Die Hormonabgabe aus dem Nebennierenmark wird fast ausschliesslich auf dem Nervenwege ausgelöst. Von den Zentren des Diencephalon und der Medulla oblongata werden über sympathische Fasern (Grenzstrang - N.splanchnicus) der Nebenniere dauernd Impulse zugeleitet, die die Hormonabgabe aus dem Nebennierenmark in Gang halten. Jede Steigerung des Sympathicotonus erhöht die Hormonabgabe. Eine allgemeine Steigerung des Sympathicotonus mit erhöhter Freisetzung von Noradrenalin an den adrenergischen Nervenendigungen hat natürlich eine etwas andere Wirkung als eine Hormonabgabe aus dem Nebennierenmark, da in beiden Fällen das Verhältnis der Katechinamine im Blut verschieden ist. Die Wirkung der einzelnen Katechinamine ist selbstverständlich in beiden Fällen gleich.

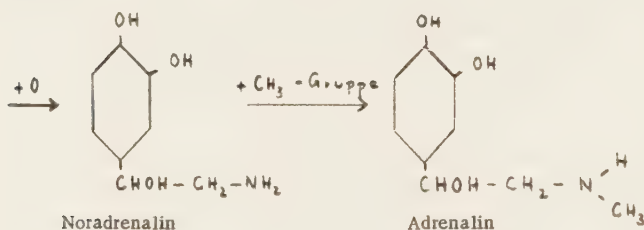
Man nimmt heute an, dass Adrenalin auf folgende Weise gebildet wird: Die Muttersubstanz des Adrenalins ist die Aminosäure Tyrosin. Dieses wird zum Dioxyphenylalanin (=Dopa) oxydiert. In der Niere wird das Dopa zum Oxytyramin decarboxyliert. Das Oxytyramin schliesslich kann im Nebennierengewebe über Noradrenalin in Adrenalin überführt werden.



Tyrosin

Dopa

Oxytyramin



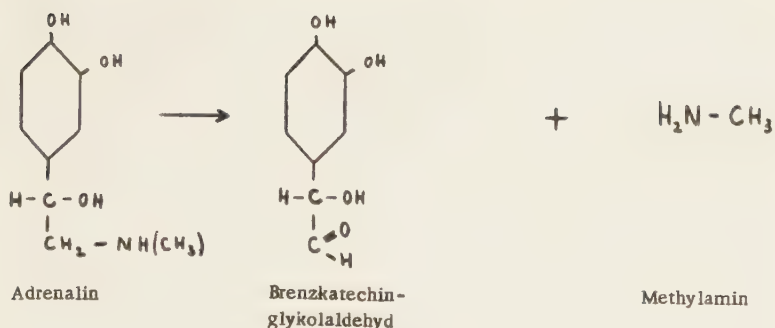
Noradrenalin

Adrenalin

Es lässt sich noch nicht mit Sicherheit sagen, ob der so formulierte Weg der Adrenalinbildung der richtige ist.

3. Abbau von Adrenalin und Noradrenalin.

Im Gewebe werden Adrenalin und Noradrenalin durch Phenoloxidasen (z.B. Tyrosinase) und Aminooxydasen abgebaut. Die in den Kreislauf gelangenden Katechinamine werden grösstenteils durch oxydativen Abbau -vorwiegend in der Leber- zerstört. Das dabei wirksame Ferment wirkt nach LEHNARTZ auch auf andere substituierte Amine, und zwar in der Weise, dass das entsprechende Amin abgestalten wird und ausserdem ein Aldehyd entsteht, z.B. aus Adrenalin Brenzkatechinglykolaldehyd und Methylamin.



Ein geringer Teil der ins Blut gelangenden Katechinamine wird unverändert -teils in freier, teils in gebundener Form- im Urin ausgeschieden (siehe S. 99). Genauer über den Abbau der Katechinamine ist noch nicht bekannt.

4. Physiologie von Adrenalin und Noradrenalin.

Obwohl sich die beiden Katechinamine nur durch die Methylgruppe am Stickstoff unterscheiden, ist ihre Wirkung eine verschiedene. Zunächst sei darauf hingewiesen, dass nach REIN Adrenalin physiologischerweise nicht blutdrucksteigernd, sondern blutverteilend wirkt, Adrenalin in physiologischen Dosen erweitert die Gefäße in tätigen Organen und verengt sie in ruhenden. Noradrenalin dagegen wirkt blutdrucksteigernd, da seine gefäßverengende Komponente überwiegt. Beide Hormone rufen sowohl Verengung als auch Erweiterung von Gefäßen, besonders im Gebiet der Arteriolen, hervor. Bei gleichen Konzentrationen wirkt dabei das Noradrenalin wesentlich stärker verengend als das Adrenalin. Die Schwellen der beiden einander gegensätzlichen Wirkungen, der Gefäßverengung und Gefäßerweiterung, variieren dabei einmal von Organ zu Organ, dann aber auch je nach dem augenblicklichen Stoffwechsel eines Organs. Unter Grundumsatz-

bedingungen überwiegt bei der Adrenalinwirkung die gefässerweiternde Komponente, sodass nur in der Haut, und im geringen Masse in Darm und Niere eine Gefässverengung eintritt, dagegen vor allem in der Muskulatur eine Gefässerweiterung. Da gleichzeitig Blut aus den Depotorganen entspeichert und die Herztätigkeit angetrieben wird (Tachycardie), ergibt sich unter der Adrenalinwirkung eine Erhöhung des Herzminutenvolumens. Adrenalin ist das Hormon der Blutverteilung. Natürlich lässt sich durch unphysiologisch hohe Dosen, wie sie im Tierversuch und therapeutisch verwendet werden, mit Adrenalin eine deutliche Blutdrucksteigerung erzielen. Anders dagegen ist Noradrenalin tatsächlich ein blutdrucksteigerndes Hormon. Die blutdrucksteigernde Wirkung des Noradrenalins -sowohl systolischer wie diastolischer Blutdruck werden durch Noradrenalin erhöht -führt über die Blutdruckzügler zur Herzhemmung, die Herzfrequenz nimmt ab (Bradycardie). Da unter Noradrenalin-Einwirkung das Schlagvolumen des Herzens nur etwas erhöht und die Pulsfrequenz nur etwas erniedrigt wird, bleibt das Minutenvolumen des Herzens praktisch gleich. Adrenalin lässt anfangs die Herzfrequenz steigen und dann langsam wieder abnehmen. Schliesslich erweitern Adrenalin und Noradrenalin die Coronargefässe des Herzens.

Adrenalin und Noradrenalin hemmen die Darmtätigkeit und führen zur Erweiterung der Pupillen.

Adrenalin erhöht den Blutzuckerspiegel durch Glykogenolyse (ist so dem Insulin entgegengesetzt) und steigert den Sauerstoffverbrauch sämtlicher Organe. Diese Oxydationssteigerung der Gewebe ist wahrscheinlich auf das Adrenochrom zurückzuführen, das als Wasserstoffüberträger bei bestimmten Oxydationen fungieren soll. Noradrenalin hat nur sehr geringe Stoffwechselwirkungen.

Dem Adrenalin kommt noch eine zentrale Wirkung zu, die dem Noradrenalin fehlt; Adrenalin steigert die Bewusstseinschelligkeit und verkürzt so die Reaktionszeit.

Zur therapeutischen Verwendung (6) der Katechinamine lässt sich sagen: Der Vorzug des Noradrenalins vor dem Adrenalin ist darin begründet, dass Noradrenalin erstens weniger toxisch ist, zweitens stärker blutdruckerhöhend wirkt, drittens keine Tachycardie und weniger Extrasystolen verursacht und viertens die bei Adrenalin manchmal auftretende lästige psychische Unruhe nicht bewirkt.

Die beiden Katechinamine spielen eine grosse Rolle im Rahmen der "ergotropen" Funktionen (HESS). Alle Wirkungen der beiden Katechinamine zusammen ermöglichen dem Organismus Maximalleistungen. BRÜCKE spricht von "Bereitschaftsreaktion" und CANNON von "Notfallsfunktion": In Fällen der Not (Kälte, Asphyxie, Schmerz, Schreck, Hypoglykämie) wird Adrenalin ausgeschieden, durch das dann auf hämatogenem Wege eine Verschiebung des gesamten Tonus eintritt.

Es sei auch noch v. EULER (6) erwähnt, der sich für eine funktionelle Trennung des hauptsächlich Adrenalin-produzierenden Nebennierenmark-Systems vom Noradrenalin-System (an den adrenergischen Nervenendigungen) ausspricht. Dies mache zwar ein Umdenken nötig, da bisher das Noradrenalin zu sehr nur als Vorläufer des Adrenalins angesehen worden sei, sei jedoch mit Kenntnis der unterschiedlichen Wirkungen der beiden Katechinamine erforderlich.

BESTIMMUNGSMETHODEN FÜR ADRENALIN UND NORADRENALIN

Die Wichtigkeit von Adrenalin und Noradrenalin für die Physiologie, die Endokrinologie, die Physiologische Chemie, die Pharmakologie, die Innere Medizin, die Chirurgie, ja für die gesamte Medizin überhaupt erforderte die Ausarbeitung von Bestimmungsmethoden für die beiden Katechinamine. Da lange Zeit Adrenalin für das einzige Hormon des Nebennierenmarks gehalten wurde, bemühte man sich anfangs, Methoden für die Adrenalin-Bestimmung zu finden. Als dann Noradrenalin als weiteres Hormon des Nebennierenmarks nachgewiesen wurde, mussten Methoden erarbeitet werden, die eine Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin nebeneinander ermöglichen. Man kann heute vier Gruppen von Bestimmungs-Methoden unterscheiden:

- A) Biologische Bestimmungs-Methoden
- B) Kolorimetrische Bestimmungs-Methoden
- C) Papierchromatographische Bestimmungs-Methoden
- D) Fluorimetrische Bestimmungs-Methoden.

Die Bestimmung der Katechinamine in Lösung ist relativ einfach. Die Schwierigkeiten beginnen jedoch, wenn der Katechinamingehalt so komplizierter Flüssigkeiten wie Blut und Harn oder der von Organextrakten untersucht werden muss. Die einzelnen, mit viel Mühe entwickelten Methoden seien im Folgenden beschrieben. Dabei wird über die biologischen Bestimmungs-Methoden nur ein Überblick gegeben werden, während die kolorimetrischen, papierchromatographischen und fluorimetrischen Bestimmungs-Methoden eine genauere Darstellung erfahren werden.

A. Biologische Bestimmungsmethoden

Im Folgenden werden zwei Methoden geschildert, die zum Nachweis der Katechinamine in Urin benutzt wurden.

1. Methode nach v. EULER (7,8)

Aufbereitung des Urins nach v. EULER/HELLNER (S. 94). Die Gesamt-Katechinamine werden bestimmt. Die unterschiedliche Aktivität von Adrenalin und Noradrenalin auf den Katzenblutdruck (KBD) und den Hühnerblinddarm (HBID) macht es möglich Adrenalin und Noradrenalin in Mischungen zu bestimmen. Der Badelösung des Hühnerblinddarms werden vor der Zugabe der Standard- oder Testlösungen 50-100 μ g Ascorbinsäure zugesetzt, um die Katechinamine vor Oxydation zu schützen. Die Werte lassen sich mit folgenden Formeln errechnen:

$$\text{Adrenalin} = x = \frac{A - a}{Q - q} ; \quad \text{Noradrenalin} = y = A - xQ.$$

Ein Beispiel sei zur Erläuterung gegeben:

- a = Noradrenalin-Äquivalente am KBD = 4 μ g
- A = Noradrenalin-Äquivalente am HBID = 20 μ g
- q = Aktivitätsverhältnis Adrenalin : Noradrenalin am KBD = 0,3
- Q = Aktivitätsverhältnis Adrenalin : Noradrenalin am HBID = 30

Die Katechinaminwerte betragen dann:

$$\begin{array}{ll} \text{Adrenalin} & = 0,54 \mu\text{g} \\ \text{Noradrenalin} & = 3,84 \mu\text{g} \end{array} \quad \text{Gesamt-Katechinamine} = 4,38 \mu\text{g}$$

2. Methode nach HAMILTON / LITCHFIELD / PEART / SOWRY (9).

Aufbereitung des Urins nach v.EULER/HELLNER (S.94). Keine Säurehydrolyse, nur die freien Katechinamine werden bestimmt. Die biologische Bestimmung erfolgt am Blutdruck der anaesthetisierten Ratte. Der Gesamt-Katechinamingehalt wird gegen bekannte Adrenalin-Noradrenalin-Mischungen bestimmt, das Verhältnis Noradrenalin zu Adrenalin in der Mischung mit Dihydroergotamin, das die Wirkung des Adrenalins umkehrt, die des Noradrenalins jedoch nur gering reduziert. Eine Mischung der beiden Amine gibt dann eine biphasige Antwort: anfangs einen Blutdruckabfall (verursacht durch das Einwirken von Dihydroergotamin auf Adrenalin), dann einen Blutdruckanstieg (verursacht durch das Einwirken von Dihydroergotamin auf Noradrenalin).

Zusammenfassender Überblick

Die biologischen Bestimmungsmethoden werden hauptsächlich in Physiologie und Pharmakologie verwendet. In Kliniken werden diese Methoden weniger geübt.

v.EULER (S.17) bestimmte die Katechinamine, indem er die unterschiedliche Aktivität von Adrenalin und Noradrenalin auf den Katzenblutdruck und den Hühnerblinddarm aufzeichnete, HAMILTON et al.(S.18), indem sie Adrenalin und Noradrenalin am mit Dihydroergotamin behandelten Rattenblutdruck gegeneinander abgrenzten. Für beide Methoden werden leider weder Fehlergrenzen noch eventuelle Verluste noch die geringsten nachweisbaren Mengen genannt.

Neben den beiden bereits geschilderten Methoden gibt es jedoch zur Bestimmung der Katechinamine noch eine Vielzahl anderer biologischer Methoden, über die abschliessend mit GUGGENHEIM (10) ein kurzer Überblick gegeben sei: "Eine pharmakologische Bestimmung von Adrenalin gründet sich auf dessen blutdrucksteigernde Wirkung an narkotisierten oder decerebrierten Tieren (Katze, Hund) (11-13). Der Adrenaliningehalt errechnet sich aus den Blutdruckerhöhungen, welche die zu untersuchenden Extrakte im Vergleich zu Adrenalin-Standard-Lösungen an denselben Versuchstieren hervorrufen. Bei Anwesenheit von Noradrenalin, welches den Blutdruck stärker erhöht als Adrenalin, müssen noch andere biologische Bestimmungsmethoden herbeigezogen werden. Hierzu eignen sich vorzugsweise Tests, die die Hemmungswirkung der sympathikomi-

metischen Amine messen und beim Adrenalin wesentlich stärker ausfallen als beim Noradrenalin, zum Beispiel die Senkung des Carotisblutdruckes nach Vorbehandlung mit Ergotoxin (14) oder anderen Sympathikolytica (15, 16), die Erschlaffung des virginellen Katzenuterus (14) und die hyperglykämische Wirkung am Kaninchen (17). Andererseits wirkt Noradrenalin an der Nickhaut der Katze stärker erregend als 1-Adrenalin (4, 18, 19). Die Konstriktion, die von Adrenalinlösungen an isolierten Froschgefäßen ausgeübt wird (20-23), ist nicht spezifisch und wird auch durch adrenalinfreie Organextrakte hervorgerufen (24). Nahe verwandte sympathikomimetische Amine können voneinander unterschieden werden durch parallele quantitative Bestimmung mit den fünf folgenden, sehr empfindlichen Testobjekten; isolierter Rattenuterus, isoliertes Rattencolon, perfundiertes Kaninchenohr, perfundierte Katzenmilz in situ, Nickhaut der Katze (25, 26)."

B. Kolorimetrische Bestimmungsmethoden

1. Methode nach WHITEHORN und SHAW.

Die kolorimetrischen Methoden waren mit die ersten, die zur Bestimmung der Katechinamine herangezogen wurden. 1935 hat WHITEHORN (27) eine Methode angegeben, die 1938 von SHAW (28) modifiziert wurde. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass Adrenalin Arsenmolybdänsäure unter Bildung einer blauen Farbe reduziert. Arsenmolybdänsäure wird noch von anderen Substanzen wie Ascorbinsäure, reduziertem Glutathion und Eserin reduziert. Um bei der Untersuchung von Blutplasma und Gewebsextrakten die Interferenz dieser Substanzen auszuschalten, arbeitete WHITEHORN mit Kieselsäure, die wohl Adrenalin, jedoch nicht die anderen Substanzen adsorbiert. Er fand jedoch nur 50% des zugefügten Adrenalins wieder und musste daher seine Ergebnisse mit einem Korrektionsfaktor multiplizieren. SHAW führte Aluminiumhydroxyd zur Adsorption des Adrenalins in die Methodik ein. Er konnte 75-80 % des zugefügten Adrenalins (0,1 μ /ccm) im Blutplasma von Kaninchen wiederfinden. Die Adsorption des Adrenalins findet nur im alkalischen Milieu statt. Wenn man den Nebennierenextrakt erst bei pH 4 mit Aluminiumhydroxyd ausschüttelt, werden Glutathion und andere mögliche Substanzen entfernt. Ascorbinsäure wird weder bei saurem noch bei alkalischem pH adsorbiert. Das Aluminiumhydroxyd, an das das Adrenalin adsorbiert wurde, wird in 4 % NaOH

aufgelöst; 2 Min. später wird das Arsenmolybdänsäurereagenz zugesetzt. Die Intensität der entwickelten Farbe wird im Leitz 2 Stufen-Kolorimeter (graue Standardlösung, Filter Nr. 9) gemessen. Die Farbintensitäten folgender Lösungen werden bestimmt: a) die der zu untersuchenden Lösung, b) die einer Standardlösung, deren Adrenalingehalt in Werten der grauen Lösung des Kolorimeters angegeben wird. c) die einer Leerlösung. Von a und b wird der Wert c abgezogen, um die Farbwerte auszuschalten, die nicht auf Adrenalin zurückzuführen sind. Aus dem Vergleich mit den Adrenalinstandardlösungen lässt sich der Adrenalingehalt der Analysen berechnen. Die kleinste Menge, die in Lösung nachgewiesen werden kann, beträgt $0,05 \text{ } \mu\text{g/ccm}$ ($= 1:5 \cdot 10^8$).

Bei Zusatz von wenig Alkali (0,35 ccm 4% NaOH) in Gegenwart von Sauerstoff vor der Zugabe des Arsenmolybdänsäurereagenz wächst die Farbintensität auf das 5-fache an. Wird zuviel Alkali zugegeben, wird die Farbintensität um weniger als das 5-fache erhöht. Dieser Vorgang dürfte sich wie folgt erklären: Adrenalin wird unter obigen Bedingungen oxydiert. Offensichtlich ist eines der Oxydationsprodukte des Adrenalins ein stärkeres Reduktionsmittel als das Adrenalin selbst und vertieft so die Farb-reaktion. Dieses Oxydationsprodukt wird bei längerer Alkalibehandlung zerstört. Die Natur dieses Oxydationsproduktes ist unbekannt. Eine Reihe Adrenalinverwandter Substanzen wurde von SHAW untersucht, doch keine entsprach dem gesuchten Oxydationsprodukt. Nur p-Sympatol ähnelte als einzige Substanz dem Adrenalin, indem es nach Alkalibehandlung ebenfalls ein Anwachsen der Farbintensität auf das 5-fache gab. Dafür wird die gleiche Seitenkette des Adrenalins und p-Sympatols verantwortlich gemacht. Da jedoch erst 2000 μg p-Sympatol 1 μg Adrenalin farbäquivalent sind, ist eine Unterscheidung leicht möglich. Mit Sicherheit war Adrenalin in Gewebsextrakten zu bestimmen, wenn die Konzentration mindestens $1:10^7$ betrug ($= 0,1 \text{ } \mu\text{g/ccm}$).

2. Methode nach JAMES.

JAMES (29) teilte 1948 eine qualitative Methode zur Unterscheidung der Katechinamine und verwandter Substanzen mit. Er oxydierte mit einer Polyphenolase, die aus den Wurzeln von *Atropa belladonna* gewonnen wurde. Eine künstliche Adrenalinlösung, die mindestens 20 μ -Adrenalin enthält, wird in ein Reagenzglas mit 2 ccm Phosphatpuffer (pH 7,8) gegeben. Etwa 50 mg Enzym werden hinzugefügt, schütteln. Das Reagenzglas wird 10 Minuten auf 30° C gehalten, und die Farbe beobachtet. Adrenalin gibt eine orange-rote Farbe (Adrenochrom), Noradrenalin - falls es vorhanden war, eine blassbraune. Das Adrenochrom ist in dieser Lösung über mehrere Stunden stabil und blässt dann ab. Die braune Farbe des Noradrenalins wird durch Kondensationsprodukte des Noradrenochroms verursacht, die sich in einer dunklen Schicht am Boden des Reagenzglases absetzen. Methyladrenalin gibt keine Farbreaktion. Bei den Reaktionen verwandter Phenole ähneln die primären Amine dem Noradrenalin, die sekundären dem Adrenalin. 3,4-Dioxytyramin gibt keine nachweisbare rote Farbe. Dopa gibt vorübergehend eine rosa Farbe, die schnell in braun umschlägt und dann als schwarzer Niederschlag leicht von dem braunen des Noradrenalins unterschieden werden kann. Corbasil gibt eine vorübergehend rote Farbe, die dann in braun übergeht; das Rot gibt den Unterschied zu Noradrenalin, das Braun den zu Adrenalin. Von den sekundären Aminen geben Epinin und n-Methylcorbasil ein unstabiles rotes Produkt, das innerhalb einer Stunde verblasst und so gegen Adrenalin zu unterscheiden ist. Eine Mischung von Adrenalin und Noradrenalin entwickelt erst eine blass-braune Farbe (Noradrenalin), der das stabile Rot (des Adrenochroms) folgt. So ist eine Unterscheidung gegen die anderen Substanzen möglich. In Gewebsextrakten muss meist Noradrenalin von Dopa unterschieden werden, was papierchromatographisch (siehe papierchromatographische Methode von JAMES S. 34) infolge der nah beieinanderliegenden R_F -Werte kaum möglich ist. Die Unterscheidung ist jedoch möglich mit der schwarzen Farbe, die Dopa beim Enzym-Test gibt. Adrenalin und Corbasil haben ebenfalls einen ähnlichen R_F -Wert; auch hier ist die Unterscheidung im Enzym-Test möglich, in dem Adrenalin eine stabile rote Farbe gibt, während Corbasil eine vorübergehende rote Farbe liefert, die dann in braun übergeht.

3. Methode nach HEINRICH / SCHULER.

HEINRICH/SCHULER (30-32) nahmen eine kolorimetrische Bestimmung der Katechinamine mit dem von ihnen angegebenen N.N.C.D.-Reagenz vor. β -naphthalinsulfosaures 4-Nitro-2-chlor-1-diazobenzol (N.N.C.D.) bildet mit Adrenalin und anderen Dioxybenzolderivaten in stark saurem Milieu intensiv gelbe Azofarbstoffe. Die Reaktion erfolgt ausser mit Adrenalin und Noradrenalin auch mit anderen Dioxybenzolderivaten, jedoch nicht mit Monophenolen, Sympatol, Ascorbinsäure und Glutathion. Sie ist auch negativ mit Aminosäuren, Aldehyden, Ketonen, Cystein, Cystin, Imidazol- und Indolderivaten in einem Konzentrationsbereich unter 100 μ -%. Dagegen dürfen Pyridin- und Chinolinderivate sowie aromatische Diamine nicht anwesend sein.

Die Bestimmung wird im Zeiss'schen Stufen-Photometer unter Verwendung des Filters S 43 durchgeführt. In einem Konzentrationsbereich der Dioxybenzole von 0-5 μ /ccm wird das Beer'sche Gesetz erfüllt. Das pH-Optimum liegt bei pH 2-3, das Temperatur-Optimum bei 35°C, die Zeitdauer der Reaktion beträgt 1 Stunde ($\pm$ 3 Minuten). Das Konzentrationsverhältnis zwischen dem zu bestimmenden Dioxybenzol und dem N.N.C.D.-Reagenz soll etwa 1:100 betragen; eine geringere Konzentration hat sich als weniger günstig erwiesen, eine höhere Konzentration verursacht, abgesehen von der bald erreichten Löslichkeitsgrenze, Eigenfärbung im Leerversuch. Die zu untersuchende Lösung soll maximal 5 μ Dioxybenzol/ccm enthalten. 10 ccm der zu untersuchenden Lösung von pH 2-3 werden in einem Reagenzglas (2,5 cm äusserer Durchmesser, eingeschliffener Stöpsel) mit 2 ccm einer 0,1 % frisch bereiteten Lösung von β -N.N.C.D. von gleichem pH versetzt und 60 Minuten in ein Wasserbad von 35°C gebracht. 12 ccm Reagenzlösung von gleichem pH dienen als Leerversuch. Nach genau 1 Stunde wird im Zeiss-Photometer kolorimetriert. Als Kuvetten eignen sich solche von 30 mm Schichtdicke; bei Konzentrationen von 1,25 - 2,5 μ /ccm genügt eine Schichtdicke von 20 mm, bei Konzentrationen von 2,5-5 μ /ccm eine solche von 10 mm. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgt an Hand von Eichkurven. Mit Sicherheit werden noch 0,5 μ Adrenalin bzw. Noradrenalin/ccm erfasst. Die Empfindlichkeit lässt sich auf etwa das 10-fache erhöhen, wenn man die entstehenden Farbstoffe mit einem geeigneten Extraktionsmittel ausschüttelt und entsprechend konzentriert. Die Farbtinten-

sität für Adrenalin ist etwa doppelt so gross wie die für Noradrenalin.

Da sich die bei der N.N.C.D.-Reaktion entstehenden Farbstoffe gegen Alkali überraschend beständig erwiesen haben, wurde die Methode modifiziert. Zunächst lässt man das N.N.C.D.-Reagenz in schwach saurem Milieu einwirken und alkalisiert danach mit Boratpuffer; dabei wird die Gelbfärbung vertieft. Bei der modifizierten Methode färbt Adrenalin nur etwa halb so stark wie Noradrenalin. Die Anwendung der modifizierten und der nicht modifizierten N.N.C.D.-Reaktion ermöglicht die selektive Erfassung von Adrenalin und Noradrenalin.

Die Katechinamin-Werte werden mit Hilfe folgender Gleichungen ermittelt: Es sei D_s die Durchlässigkeit der N.N.C.D.-Reaktion im stark Säuren und D_u die Durchlässigkeit im schwach Säuren, K_{2s} die Tangente des Winkels gebildet aus der logarithmisch aufgetragenen Durchlässigkeitskurve und der Parallelen zur Abszisse gemessen mit der Reaktion stark saurer Adrenalinlösungen, K_{1s} die Tangente des Winkels stark saurer Noradrenalinlösungen und K_{2n} und K_{1n} die Tangenten derselben Winkel bei der Reaktion in schwach saurem Milieu, dann gilt für die Konzentration c_1 (Noradrenalin / ccm) und c_2 (Adrenalin/ccm):

$$\log D_s = -K_{1s}c_1 - K_{2s}c_2$$

$$\log D_u = -K_{1n}c_1 - K_{2n}c_2$$

Aus diesen beiden Gleichungen ergibt sich unter Anwendung der üblichen mathematischen Gesetze:

$$\text{z.B.} \quad c_1 = \frac{K_{2n} \cdot \log D_s - K_{2s} \cdot \log D_u}{K_{1n} \cdot K_{2s} - K_{1s} \cdot K_{2n}}$$

Es lassen sich also mittels der genannten Gleichungen die Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin nebeneinander bestimmen.

4. Methode nach v. EULER / HAMBERG.

Die kolorimetrische Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin erreichten v. EULER/HAMBERG (33,34) wie folgt: Sie oxydierten Adrenalin und Noradrenalin mit n-Jodlösung zu Adrenochrom bzw. Noradrenochrom. Adrenochrom bzw. Noradrenochrom färben je nach Konzentration die zu untersuchende Lösung rosarot bis rot. Bei pH 4,0 (Acetatpuffer) werden innerhalb 1 1/2 Minuten alles Adrenalin und weniger als 10% des Noradrenalins oxydiert. Bei pH 6,0 (Acetatpuffer) wird innerhalb 3 Minuten alles Adrenalin und alles Noradrenalin oxydiert. Überschüssiges Jod wird mit 0,05 n Thiosulfat entfernt. Die Farbwerte werden nach 5 Minuten bestimmt. Kolorimetriert wird im Photometer mit einer Wellenlänge von 529 m μ . Die entsprechenden Leerwerte werden abgezogen. Die Berechnung erfolgt gegen Eich-Standard-Lösungen von 100 γ Adrenalin bzw. Noradrenalin. Die Eichfaktoren für Adrenalin und Noradrenalin sowie der relative Prozentgehalt des Noradrenalins, das bei pH 4,0 in 1 1/2 Minuten oxydiert wird, ergeben sich bei der Bestimmung der Standardlösungen. Der Adrenalin- bzw. Noradrenalengehalt der zu untersuchenden Lösungen wird nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$\text{Noradrenalin} = n \cdot \frac{b - a}{1 - p}$$

$$\text{Adrenalin} = m \cdot \left[a - p \cdot \frac{b - a}{1 - p} \right]$$

a = Wert bei pH 4,0 (1 1/2 Minuten Jodbehandlung)

b = Wert bei pH 6,0 (3 Minuten Jodbehandlung)

m = Eichfaktor für Adrenalin

$$\left(\frac{100}{\text{Wert für 100 } \gamma} \right)$$

n = Eichfaktor für Noradrenalin

$$\left(\frac{100}{\text{Wert für 100 } \gamma} \right)$$

p = relative Noradrenalinmenge, die bei pH 4,0 in 1 1/2 Minuten oxydiert wird.

Die errechneten Werte stimmen fast 100 %ig mit den tatsächlichen überein. Die Methode wurde mehrfach an Nebennierenextrakten erprobt und

eine gute Übereinstimmung mit der biologischen Methode von v.EULER (8) gefunden. SUZUKI/OZAKI (35) arbeiteten mit der gleichen Methode, oxydierten jedoch bei pH 3,6 und 5,6 (Acetatpuffer) mit Permanganatlösung (3 g KMnO_4 , 24 ccm H_2O , 8 ccm Milchsäure). Das überschüssige Oxydationsmittel wurde von ihnen mit 3% H_2O_2 entfernt.

5. Methode nach JAMES / KILBEY.

JAMES/KILBEY (36) trennten Adrenalin und Noradrenalin papierchromatographisch mit Butanol-Essigsäure (4 Teile n-Butanol, 1 Teil Eisessig, 5 Teile H_2O werden miteinander geschüttelt, die untere Schicht wird entfernt) und eluierten die Katechinamine mit 0,01 n HCl aus den Chromatogrammen. Die Eluate wurden kolorimetrisch bestimmt. Folgende Reagentien sind nötig:

- a) 5 % NaCN Lösung, die 2 ccm einer starken Ammoniaklösung im Liter enthält. Die Lösung darf nicht älter als 4 Wochen sein.
- b) Arsenphosphorwolframsäure : 100 g Natriumwolframat werden in 600 ccm H_2O in einer Literflasche aufgelöst. Dazu kommen 50 g Arsenpentoxyd, 25 ccm 85 % Orthophosphorsäure und 20 ccm konzentrierte HCl. Die Mischung wird 20 Minuten gekocht, abgekühlt und dann mit H_2O auf 1 l aufgefüllt. Die so bereitete Lösung ist unbegrenzt haltbar.

Zu 6 ccm der zu bestimmenden Adrenalin- oder Noradrenalinlösung werden 2 ccm der Natriumcyanidlösung (a) und dann 0,4 ccm der Arsenphosphorwolframsäure (b) gegeben. Schütteln und 20 Minuten stehen lassen. Dann wird die Mischung in eine 10 ccm Flasche gegeben, das Reagenzglas mit 1 ccm H_2O nachgespült, das ebenfalls in die 10 ccm Flasche gebracht wird. Mit H_2O auf 10 ccm auffüllen und wieder schütteln. Etwa 8 ccm der Lösung werden in die Zelle (Durchmesser 1 cm) eines Spekter-Absorptiometers gefüllt. Orange-Filter Nr.3 wird verwendet. Die Farbwerte werden innerhalb der nächsten 15 Minuten abgelesen. Bei längerem Stehen bildet sich ein weisser Niederschlag. Diesen kann man wenn nötig abfiltrern, ohne dass die Farbtintensität geschwächt wird.

Adrenalin und Noradrenalin entwickeln eine blaue Farbe. Adrenalin färbt jedoch weit stärker als Noradrenalin. Deshalb müssen für beide Stoffe getrennte Eichkurven ermittelt werden. Die erhaltenen Eichkurven sind im Konzentrationsbereich 0 - 50 μ g Adrenalin bzw. Noradrenalin linear. Bei über 50 μ g Adrenalin wird die Farbe so dunkel, dass man die Lösung für eine exakte Bestimmung verdünnen muss. Die genauesten Ergebnisse erhält man bei einem Adrenalingehalt von 5-50 μ g. Bei Noradrenalin liegt die obere Grenze weit höher, da dieses -wie ja schon erwähnt- eine schwächere Farbe entwickelt. Die mit dem Spekterphotometer gewonnenen Eichkurven waren konstant. Der Adrenalin- bzw. Noradrenalingehalt der zu untersuchenden Lösungen konnte einfach im Vergleich mit den Eichkurven errechnet werden. 5 μ g Adrenalin bzw. Noradrenalin lassen sich mit Sicherheit nachweisen.

6. Methode nach SALGÓ.

Dikalimercuritetraarhodanid gibt nach SALGÓ (37) mit Adrenalinlösungen je nach deren Konzentration eine intensiv rosa bis rubinrote Färbung. 0,01 mg Adrenalin in 1 ccm Lösung lässt sich noch deutlich nachweisen. Da das Dikalimercuritetraarhodanid mit anderen Aminen keine ähnliche Reaktion ergibt, kann es als das spezifische Reagenz auf das Adrenalin angesehen werden. Die Farbe ändert sich selbst nach 24 Stunden nicht, weshalb das Reagenz auch zur quantitativen kolorimetrischen Adrenalinbestimmung geeignet zu sein scheint. SALGÓ hat in einer Tabelle eine gute Übersicht über eine Anzahl Farbreaktionen des Adrenalins geboten. Aus diesem Grunde sei seine Tabelle hier wiedergegeben (Tab. 1).

TABELLE 1

Übersicht über einige Farbreaktionen des Adrenalins (SALGÖ, 37)

Verfasser	Reagenz	auftretende Farbe	Empfindlichkeit der Reaktion in μccm	Haltbarkeit der Färbung
Vulpian (38)	FeCl_3	grün	0,5 mg	1-2 Minuten
Krukenberg (39)	$\text{FeCl}_3 + \text{NH}_4\text{OH}$	rötlich-braun	0,5 mg	einige Stunden
Mühlmann (40)	HgCl_2	blassrosa	0,5 mg	einige Stunden
Comessati (41-43)	HgCl_2	blassrosa	0,5 mg	einige Stunden
Ewins (44, 45)	$\text{HgCl}_2 + \text{CH}_3\text{COONa}$	blassrosa	0,5 mg	einige Stunden
Krauss (46, 47)	$\text{HJO}_3 + \text{CHCl}_3$	blassrosa	1,0 mg	einige Stunden
Russmann (48)	$\text{HgCl}_2 + \text{Sulfanilsäure} + \text{KH}(\text{IO}_3)_2$	blassgelb	0,1 mg	einige Stunden
Stuber/Russmann/ Pröbsting (49)	$\text{HgCl}_2 + \text{Sulfanilsäure} + \text{KH}(\text{IO}_3)_2$	blassgelb	0,1 mg	einige Stunden
Viale (50)	$\text{HgCl}_2 + \text{Sulfanilsäure} + \text{KH}(\text{IO}_3)_2$	blassgelb	0,1 mg	einige Stunden
Grübler (51)	n-NaOH	blassrosa	1,0 mg	1-2 Minuten
Gunn / Harrison (52)	10 % NaOH	blassrötlich- braun	1,0 mg	1-2 Minuten
Ekkert (53)	10 % alkoholisches KOH	blassrosa	1,0 mg	1-2 Minuten
Boas (54, 55)	konz. HCl	violett	10,0 mg	einige Stunden
Pellerin (56, 57)	$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg} + \text{CH}_3\text{COONa}$	blassrosa	0,5 mg	8-10 Minuten
Ekkert (58, 59) (nicht spezifisch)	$\text{SeO}_2 + \text{konz. H}_2\text{SO}_4$	roter Niederschlag	0,01 mg	dauernd
Ekkert (58, 59)	NaNO_2	blassrosa	0,1 mg	1-2 Stunden
Salgö (37) (sehr spezifisch)	$\text{K}_2\text{Hg}(\text{SCN})_4$	intensiv rosarot	0,01 mg	mehr als 24 Stunden

7. Methode nach REISS.

REISS (60) teilte 1955 eine empfindliche quantitative Methode zur kolorimetrischen Bestimmung der Katechinamine mit. Adrenalin und Noradrenalin werden bei kurzzeitiger Behandlung mit salpetriger Säure und anschließender Alkalisierung zu intensiv roten Farbstoffen umgesetzt. Über den Reaktionsmechanismus können noch keine endgültigen Angaben gemacht werden. Adrenalin gibt die gleiche Farbreaktion, nicht jedoch Brenzkatechin, Chloracetobrenzkatechin, Ephedrin und Sympatol. (Nor) Adrenochromähnliche Verbindungen werden nicht gebildet. Dies geht daraus hervor, dass die Farbe im alkalischen Milieu sehr beständig ist, während Adrenochrom bzw. Noradrenochrom in diesem Milieu sofort zerstört werden. Ausserdem liegt das Absorptionsmaximum von Adrenochrom und Noradrenochrom bei $529\text{ m}\mu$ gegenüber $500\text{ m}\mu$ bei den vorliegenden Reaktionsprodukten.

Methodik:

Das Verfahren unterteilt sich in 2 Stufen; einmal werden die beiden Katechinderivate bei pH 1,9 zum anderen bei pH 1,1 mit Natriumnitrit umgesetzt. Man erhält somit 2 Werte, die bei Kenntnis der Eichkurven ohne weiteres auf den Gehalt an Adrenalin und Noradrenalin im Ausgangsprodukt umgerechnet werden können.

1. Das 20-200 μg -Adrenalin und Noradrenalin enthaltende Material wird in einem 25 ccm Messkolben in 5 ccm einer Pufferlösung von pH 1,9 (Salzsäure-Natriumcitrat) gelöst. Genau 6 Minuten nach erfolgter Zugabe von 1 ccm einer 0,5 %igen Natriumnitritlösung wird die schwach gelb-grün gefärbte Lösung mit 3 ccm einer 30 %igen NaOH versetzt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Nach 5 Minuten wird die Farbintensität bei $500\text{ m}\mu$ gemessen und der Leerwert einer entsprechenden Leerlösung (ohne Natriumnitrit) abgezogen.
2. Mit einer 2. Probe des Ausgangsmaterials wird die gleiche Operation durchgeführt, im Unterschied zu 1. wird jedoch eine Pufferlösung mit pH 1,1 (Salzsäure-Natriumcitrat) verwendet. Desgleichen beträgt die Zeit zwischen Natriumnitrit- und Laugenzugabe nicht wie oben 6, sondern 8 Minuten.
Sollten nicht genügende Mengen Ausgangsmaterial zur Verfügung stehen, so kann in der gleichen Weise wie oben beschrieben verfahren

werden, wobei lediglich den Verhältnissen entsprechend statt auf 25 ccm nur auf 20, 15 oder 10 ccm aufgefüllt wird.

Die Messung erfolgt im Elko II der Firma Zeiss unter Verwendung des Filters S 49 und der 1 cm Kuvette. Die angegebenen Zeiten und Konzentrationen stellen optimale Arbeitsbedingungen dar und müssen genau eingehalten werden, um reproduzierbare Werte zu erzielen. Lediglich in Bezug auf Laugenmenge sowie Zeit nach der Laugenzugabe ist eine genaue Einhaltung der Vorschrift nicht unbedingt notwendig, da die Farbintensität von diesen beiden Faktoren weitgehend unabhängig ist. Die Berechnung der Analysen erfolgt nach den Formeln.

$$c_A = \frac{E_{1,1} \cdot \epsilon_1 \cdot d_1 - E_{1,9} \cdot \epsilon_3 \cdot d_3}{\epsilon_1 \cdot \epsilon_4 \cdot d_1 \cdot d_4 - \epsilon_3 \cdot \epsilon_2 \cdot d_2 \cdot d_3}$$

und

$$c_N = \frac{E_{1,9} - \epsilon_2 \cdot c_A \cdot d_2}{\epsilon_1 \cdot d_1}$$

Dabei sind:

c_A der Gehalt an Adrenalin in μ / 25 ccm

c_N der Gehalt an Noradrenalin in μ / 25 ccm

$E_{1,1}$ die Extinktion (Nitritbehandlung bei pH 1,1)

$E_{1,9}$ die Extinktion (Nitritbehandlung bei pH 1,9)

ϵ_1 der spezielle Extinktionskoeffizient für Noradrenalin
(Nitritbehandlung pH 1,9)

ϵ_2 der spezielle Extinktionskoeffizient für Adrenalin
(Nitritbehandlung pH 1,9)

ϵ_3 der spezielle Extinktionskoeffizient für Noradrenalin
(Nitritbehandlung pH 1,1)

ϵ_4 der spezielle Extinktionskoeffizient für Adrenalin
(Nitritbehandlung pH 1,1)

d_1, d_2, d_3, d_4 die entsprechenden Schichtdicken.

Die speziellen Extinktionskoeffizienten sind alle auf 25 μ /ccm bezogen. Die Extinktionen $E_{1,1}$ und $E_{1,9}$ werden durch Abzug des Leerwertes vom Messwert erhalten.

Bei Anwendung immer der gleichen Kuvettenschichtdicke vom 1 cm vereinfachen sich die obigen Formeln zu:

$$c_A = \frac{E_{1,1} \cdot \epsilon_1 - E_{1,9} \cdot \epsilon_3}{\epsilon_1 \cdot \epsilon_4 - \epsilon_3 \cdot \epsilon_2}$$

und

$$c_N = \frac{E_{1,9} - \epsilon_2 \cdot c_A}{\epsilon_1}$$

Als spezielle Extinktionskoeffizienten wurden bei Verwendung des Elko II, des Filters S 49 sowie der 1 cm-Kuvette die folgenden Werte gefunden:

$$\epsilon_1 = 0,00196 \quad (\mu/25 \text{ ccm})$$

$$\epsilon_2 = 0,00144 \quad (\mu/25 \text{ ccm})$$

$$\epsilon_3 = 0,000887 \quad (\mu/25 \text{ ccm})$$

$$\epsilon_4 = 0,000887 \quad (\mu/25 \text{ ccm})$$

d.h. unter anderem, dass durch Nitritbehandlung bei pH 1,1 die Farbintensität der aus Adrenalin entstandenen Rotfärbung gleich der aus Noradrenalin erhaltenen ist.

Fehlergrenze der Methode: $\pm 5\%$, wenn die Gesamtmenge an Adrenalin und Noradrenalin 200 μ /25 ccm nicht wesentlich überschreitet.

Die entwickelte Methode bietet gegenüber den bisher beschriebenen den Vorteil grösserer Spezifität, sowie der Herabsetzung der Erfassungsgrenze auf 0,5 μ /ccm. Ausserdem ist die zu messende Färbung sehr beständig und somit für kolorimetrische Messungen besser geeignet als die durch Oxydation entstehenden Verbindungen Adrenochrom und Noradrenochrom.

Zusammenfassender Überblick

Es werden hauptsächlich solche Methoden geschildert, die eine kolorimetrische Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin nebeneinander erlauben. Einen Überblick über die behandelten Methoden gibt Tabelle 2. Zum kolorimetrischen Nachweis von Adrenalin sei auf die Tabelle von SALGÓ (S.27) verwiesen.

Die Intensität der entwickelten Farben wird im Stufen-Kolorimeter gemessen. Es werden jeweils bestimmt: die Farbintensität der zu untersuchenden Lösung, die einer Standardlösung und die einer Leerlösung. Nach Subtraktion der Leerwerte ergeben sich im Vergleich mit den Standardlösungen die gesuchten Katechinaminwerte.

Arsenmolybdänsäure (WHITEHORN/SHAW; S.19) wird von Adrenalin unter Bildung einer blauen Farbe reduziert. Da Ascorbinsäure, reduziertes Glutathion und Eserin das Reagenz ebenfalls reduzieren, muss das Adrenalin durch Adsorption an Kieselsäure (WHITEHORN; S.19) oder besser an Aluminiumhydroxyd (SHAW; S.19) aus Gewebsextrakten und aus Blutplasma abgetrennt werden. In Gewebsextrakten lassen sich noch 0,1 μ g Adrenalin/ccm nachweisen.

In ähnlicher Weise wird Arsenphosphorwolframsäure (JAMES/KILEEY; S.25) von Adrenalin und Noradrenalin reduziert; dabei entwickeln beide Katechinamine eine blaue Farbe. Adrenalin färbt jedoch weit stärker als Noradrenalin. Bei Kenntnis der Eichkurven beider Stoffe lassen sich diese nebeneinander bestimmen. 5 μ g Adrenalin bzw. Noradrenalin lassen sich mit Sicherheit nachweisen.

Oxydiert man mit Polyphenolasen (JAMES; S.21), dann entsteht aus Adrenalin das orangerote Adrenochrom und aus Noradrenalin das durch Kondensationsprodukte blassbraun gefärbte Noradrenochrom. Bei den Reaktionen verwandter Phenole ähneln die primären Amine dem Noradrenalin, die sekundären dem Adrenalin. Dopa gibt eine schwarze Farbe. Bei gleichzeitiger Anwendung der kolorimetrischen (S.21) und der papierchromatographischen (S.34) Methode nach JAMES lässt sich Dopa auch gut von Noradrenalin unterscheiden.

Eine Oxydationsfärbung ist auch die Behandlung von Adrenalin und

Noradrenalin mit n-Jodlösung (v. EULER/HAMBERG; S. 24), wobei das rote Adreno- bzw. Noradrenochrom entsteht. Bei pH 4 werden innerhalb 1 1/2 Minuten alles Adrenalin, aber nur weniger als 10% des Noradrenalins oxydiert. Bei pH 6 wird innerhalb 3 Minuten alles Adrenalin und alles Noradrenalin oxydiert. Auf Grund dieses unterschiedlichen Verhaltens kann man Adrenalin neben Noradrenalin bestimmen.

Zu intensiv roten Farbstoffen werden Adrenalin und Noradrenalin bei kurzzeitiger Behandlung mit salpetriger Säure und anschließender Alkalisierung (REISS; S. 28) umgesetzt. Der genaue Ablauf dieser Reaktion ist noch nicht geklärt. Adrenochrom- bzw. noradrenochromähnliche Verbindungen werden dabei nicht gebildet. Die Katechinamine werden einmal bei pH 1,9, zum anderen bei pH 1,1 mit Natriumnitrit umgesetzt. Man erhält somit 2 Werte, die bei Kenntnis der Eichkurven auf den Gehalt an Adrenalin und Noradrenalin im Ausgangsprodukt umgerechnet werden können. Es lassen sich 0,5 µg/ccm Adrenalin bzw. Noradrenalin nachweisen.

Mit β-naphthalinsulfosaurem-4-nitro-2-chlor-1-diazobenzol (N.N.C.D.) bilden Adrenalin und Noradrenalin intensiv gelbe Azofarbstoffe (HEINRICH/SCHULER; S. 22). Andere Dioxybenzolderivate sowie Pyridin-, Chinolinderivate und aromatische Diamine dürfen nicht anwesend sein (Genaueres über die Spezifität S. 22). Bei Durchführung der Reaktion in stark saurem Milieu färbt Adrenalin etwa doppelt so stark wie Noradrenalin. Lässt man jedoch das N.N.C.D.-Reagenz zunächst in schwach saurem Milieu einwirken und alkalisiert danach mit Boratpuffer, dann wird die Gelbfärbung vertieft. Bei Anwendung dieser modifizierten Methode färbt Adrenalin nur etwa halb so stark wie Noradrenalin. Modifizierte und nicht modifizierte N.N.C.D.-Reaktion ermöglichen gemeinsam die selektive Erfassung von Adrenalin und Noradrenalin. Es lassen sich 0,5 µg/ccm Adrenalin bzw. Noradrenalin erfassen.

TABELLE 2: Kolorimetrische Methoden zur Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin

Verfasser	Reagenz	Adrenalin				Noradrenalin			
		Farbe	geringste nachweisbare Menge		Farbe	geringste nachweisbare Menge		Farbe	geringste nachweisbare Menge
WHITEHORN u. SHAW (S. 19)	Arsenmolybdänsäure	blau		0,1 μ /ccm	-			-	
JAMES/KILBEY (S. 25)	Arsenphosphor- wolframsäure	blau		5 μ	blau			5 μ	
SALGÓ (S. 26)	Dikalimercuri- tetrahydroxid	rosa bis rubinrot		10 μ	-			-	
JAMES (S. 21)	Polyphenolase	orangerot		-	blassbraun			-	
v. EULER/HAMBERG (S. 24)	n-Iodlösung	rosarot bis rot		-	rosarot bis rot			-	
REISS (S. 28)	Natriumnitrit + NaOH	intensiv rot		0,5 μ /ccm	intensiv rot			0,5 μ /ccm	
HEINRICH/SCHULER (S. 22)	β -naphthalin- sulfosaures - 4-Nitro-2-chlor- 1-diazobenzol	gelb		0,5 μ /ccm	gelb			0,5 μ /ccm	

C. Papierchromatographische Bestimmungsmethoden

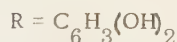
Adrenalin und Noradrenalin lassen sich als Salze durch Papierchromatographie trennen. In letzter Zeit wurde eine Reihe papierchromatographischer Methoden zur Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin ausgearbeitet.

1. Methode nach JAMES.

Als erstem gelang 1948 JAMES (29) der papierchromatographische Nachweis der Katechinamine:

1-dimensionales, aufsteigendes Chromatogramm mit Whatman Nr.1 - Papier. Die Chromatogramme liefen 20 Stunden bei Zimmertemperatur. Als Entwicklerlösung wurde mit Wasser gesättigtes Phenol verwendet. Die Amine werden als Hydrochloride in neutraler oder schwach saurer Lösung aufgetragen (bei diesem pH sind sie in der Luft stabil und werden nicht zerstört, wenn man auf 100°C erhitzt, um das Phenol zu entfernen). 0,44 % $K_3Fe(CN)_6$ in Phosphat-Puffer pH 7,8 wird zum Besprühen benutzt. Dabei werden die Katechinamine oxydiert. Adrenalin gibt einen braun-roten Fleck, Noradrenalin einen leuchtend roten. Methyladrenalin gibt bei der Oxydation keine Farbe, da kein Indolring geschlossen werden kann. Das Kaliumferricyanid wird jedoch durch Reduktion gebleicht, sodass an der Stelle des Methyladrenalins ein weisser Fleck zurückbleibt, solange keine übermässigen $K_3Fe(CN)_6$ -Mengen aufgesprüht werden. Sobald der weisse Fleck auftaucht, kann man das Methyladrenalin mit einem Tropfen stark verdünnten $CuSO_4$ nachweisen: In der Mitte erhält man einen roten Fleck (Ferrocyanid), darum herum Braun (Ferricyanid, da hier kein Reduktionsmittel vorhanden). Folgende R_F -Werte wurden gefunden:

Substanz	R _F -Wert	Formel
Noradrenalin	0,216	R-CHOHCH ₂ NH ₂
Dopa	0,230	R-CH ₂ CHCOOHNH ₂
3,4-Dioxytyramin	0,320	R-CH ₂ CH ₂ NH ₂
Corbasil	0,408	R-CHOHCHCH ₃ NH ₂
Adrenalin	0,441	R-CHOHCH ₂ NHCH ₃
n-Methylcorbasil	0,706	R-CHOHCHCH ₃ NHCH ₃
Epinin	0,760	R-CH ₂ CH ₂ NHCH ₃
Methyladrenalin	0,796	R-CHOHCH ₂ N(CH ₃) ₂



Die Tabelle zeigt, dass die Wanderung obiger Substanzen in Phenol hauptsächlich von der endständigen Aminogruppe abhängig ist und dass der R_F-Wert wächst, wenn die endständige Aminogruppe methyliert ist. Man kann jeweils zwei Stoffe unterscheiden, wenn deren R_F-Werte um mehr als 0,1 differieren. Daher kann man mit dieser Methode eine ideale Trennung der drei Adrenaline erreichen. Zu beachten ist, dass die Katechinamine dabei als Hydrochloride vorliegen müssen, und nicht als Bitartrate, wie sie im Handel erhältlich sind (61). Die übrigen untersuchten Substanzen lassen sich mit der kolorimetrischen Methode von JAMES (29) unterscheiden (siehe S.21).

2. Methode nach GOLDENBERG/FABER/ALSTON/CHARGAFF.

GOLDENBERG/FABER/ALSTON/CHARGAFF (62) haben die Methode von JAMES etwas modifiziert: 1-dimensionales, aufsteigendes Chromatogramm mit Whatman Nr.1-Papier. Als Entwicklerlösung wird eine Mischung von 98 ccm mit Wasser gesättigtem Phenol, 2 ccm 88% Phenol und 0,1 % 8-Oxychinolin verwendet. Das 8-Oxychinolin wird zugesetzt, um eine unerwünschte Ausdehnung der Farbflecken zu ver-

meiden. Der Entwickler wird auf den Boden des Glaszylinders gegossen und dieser mit einer Glasplatte abgedeckt, damit die Atmosphäre im Innern des Glaszylinders mit den Dämpfen der Entwicklerlösung gesättigt wird. Die Adrenalin- bzw. Noradrenalinlösungen werden 0,0025 ccm-weise mit einer Gilmontbürette aufgetragen. Die einzelnen Tropfen müssen immer erst bei Zimmertemperatur trocknen, bevor der nächste Tropfen am gleichen Punkt aufgebracht wird. Die Chromatogramme sind entwickelt, wenn die Front des phenolischen Entwicklers 22-27 cm oberhalb der Startlinie angelangt ist; dies dauert etwa 14-16 Stunden. Die entwickelten Chromatogramme werden 1 Stunde bei Zimmertemperatur getrocknet und dann mit 0,44 % $K_3Fe(CN)_6$ in 0,2 m Phosphatpuffer (pH 8,3) besprüht. 1 μ g Adrenalin bzw. Noradrenalin lassen sich nachweisen.

Die von JAMES (29) angegebene und von GOLDENBERG/FABER/ALSTON CHARGAFF (62) modifizierte papierchromatographische Trennung der Katechinamine wurde 1949 von SCHULER/HEINRICH/BUCHS (61) bestätigt. SCHULER/HEINRICH/BUCHS konnten die gleichen R_F -Werte wie JAMES ermitteln.

3. Methode nach v. EULER/HAMBERG.

v. EULER/HAMBERG (63) arbeiteten mit Grycksbo OB-Papier. Als Entwicklerlösung benutzten sie mit 1 n-HCl gesättigtes n-Butanol. Mit diesem Entwickler wurde nach ihren Angaben bei 23-26°C im absteigenden Chromatogramm (20-24 Stunden) eine gute Trennung von Adrenalin und Noradrenalin erreicht. Durch Zugabe von Essigsäure liess sich die Trennungszeit etwas abkürzen, die Flecken wurden jedoch dabei mehr ausgebreitet und weniger scharf begrenzt. 5-10 μ g Adrenalin bzw. Noradrenalin aus Adrenalin- bzw. Noradrenalinstandardlösungen (in 0,1 n-HCl und H_2O aufgelöst) wurden aufgetragen. Im aufsteigenden Chromatogramm (30 Stunden) bei 25° C kam man mit etwas kleineren Substanzmengen aus. Die bei 60-80° C getrockneten Chromatogramme wurden mit 0,44% $K_3Fe(CN)_6$ in Phosphatpuffer pH 7,7 besprüht und dabei die Katechinamine zu farbigen Chinonverbindungen oxydiert. Der rote Fleck des Adrenalins liess sich leicht von dem blauroten des Noradrenalins unter-

scheiden. Die R_F -Werte konnten nicht bestimmt werden. In einer weiteren Arbeit wurden jedoch von v.EULER/HAMBERG (64) bei Verwendung von Butanol-Salzsäure als Entwickler folgende R_F -Werte genannt:

Substanz	R_F -Wert
Noradrenalin	0,16
Adrenalin	0,25
Oxytyramin	0,31

1950 wiederholten JAMES/KILBEY (65) die Versuche nach v.EULER/HAMBERG (63). Sie mussten feststellen, dass sich die R_F -Werte mit dieser Methode nicht bestimmen liessen. Desgleichen teilten SCHULER/HEINRICH/BUCHS (61) mit, eine papierchromatographische Trennung der Katechinamine mit Butanol-Salzsäure als Entwickler sei ihnen nicht möglich gewesen. Auf der Suche nach besseren Entwicklerlösungen arbeiteten JAMES/KILBEY dann mit organischen Säuren.

4. Methode nach JAMES/KILBEY.

Als Entwickler wurden von JAMES/KILBEY (65) verwendet:

- Butanol-Essigsäure (4 Teile n-Butanol, 1 Teil Eisessig, 5 Teile Wasser miteinander schütteln, die untere Schicht wird entfernt).
- Butanol-Trichloressigsäure (5 g Trichloressigsäure werden in 100 ccm Wasser aufgelöst und dann zu 80 ccm n-Butanol gegeben. Schütteln, die untere Schicht wird entfernt.)

Die Standardlösungen wurden jeweils mit den entsprechenden Säuren hergestellt. 0,015 ccm Lösung, die etwa 0,03 mg Adrenalin bzw. Noradrenalin enthielten, wurden mit einer Agla-Pipette aufgebracht und die 1-dimensionalen, aufsteigenden Chromatogramme (Whatman Nr.1-Papier) in einer mit dem verwendeten Entwickler gesättigten Atmosphäre gestartet. Leichtes Trocknen der Chromatogramme entfernte nicht alle Säure. Daher musste der Indikator mehr Alkali enthalten als früher. Als Indikator diente 0,44 % $K_3Fe(CN)_6$ in 0,2 m Phosphatpuffer pH 8,3. Die Chromatogramme, die mit Butanol-Trichloressigsäure entwickelt

wurden, wurden vorsichtshalber noch über eine Flasche mit 0,88 % Ammoniak gehalten, um die Säurereste zu neutralisieren. Dies verstärkte manchmal die Reaktion. Adrenalin wurde als rosaroter, Noradrenalin als malvenfarbiger Fleck nachgewiesen. Als R_F -Werte wurden gefunden:

Substanz	Entwickler	R_F -Wert
Noradrenalin	Butanol-Essigsäure	0,25
Noradrenalin	Butanol-Trichloressigsäure	0,33
Adrenalin	Butanol-Essigsäure	0,31
Adrenalin	Butanol-Trichloressigsäure	0,45
Methyladrenalin	Butanol-Essigsäure	0,31

Ergebnis: Keine der Trennungen war so gut wie mit Phenol als Entwickler. Nach 22 Stunden waren jedoch bei Entwicklung mit Essigsäure und Trichloressigsäure die Adrenalin- und Noradrenalin-Flecken vollständig getrennt. Die R_F -Werte blieben die gleichen, gleichgültig ob man die Amine einzeln oder in Mischung der zu untersuchenden Lösung zusetzte. Methyladrenalin lässt sich bei Verwendung dieser Entwickler nicht von Adrenalin unterscheiden, da es den gleichen R_F -Wert wie Adrenalin gibt. Mit Trichloressigsäure als Entwickler erhält man die grössten Unterschiede zwischen den R_F -Werten. Dieser Vorteil wird jedoch durch das stärkere "Zerfliessen" der Flecken gemindert.

5. Methode nach GLAZKO/DILL.

1951 teilten GLAZKO/DILL (66) eine papierchromatographische Methode zur Bestimmung der Katechinamine mit: Adrenalin bzw. Noradrenalin werden in Methanol, das Spuren von HCl enthält, zu Standardlösungen aufgelöst. Die 1-dimensionalen, absteigenden Chromatogramme werden mit wassergesättigtem Phenol in einer Atmosphäre von HCl entwickelt. Die getrockneten Chromatogramme werden mit folgender Indikatorlösung besprüht: 0,5 g Natrium- β -naphthochinon-4-sulfonat werden in 100 ccm 0,2 m Boratpuffer pH 8,9 aufgelöst. Als End-pH des Reagenz ergibt sich 8,6. Der Indikator muss vor Gebrauch immer frisch bereitet werden. Mit diesem Reagenz entwickelt Noradrenalin eine intensiv blaue Farbe (in

15-30 Minuten); Adrenalin gibt eine rosarote Farbe, Dopa eine gelbe Farbe, die stufenweise in blaugrau übergeht. Diese Farbdifferenz lässt Dopa gut von Noradrenalin unterscheiden, was auf Grund ihrer nah beieinanderliegenden R_F -Werte bisher nicht mit Sicherheit möglich war (vgl. S. 21). Niedrigere pH-Werte (8,3-7,5) des Indikators geben eine Missfärbung des Papieruntergrundes. Man muss daher mit pH 8,6 arbeiten. Wenn grosse Säuremengen anwesend sind, bedampft man die Chromatogramme mit Ammoniak, bevor man sie besprüht. Es lassen sich weniger als 1 μ -Adrenalin bzw. Noradrenalin/qcm Papier nachweisen.

6. Methode nach SHEA.

SHEA (67) setzte als Erster die mit wässrigem Phenol entwickelten Chromatogramme dem UV-Licht aus. Die Chromatogramme wurden in konzentrierten Ammoniakdampf gehalten und mit UV-Licht erregt. Dabei wurde innerhalb 1 Minute die Lage des Adrenalins durch seine apfelgrüne Fluoreszenz angezeigt. Die Chromatogramme liefen 18 Stunden, 10 μ -Adrenalin liessen sich als Minimum nachweisen. Nur Adrenalin wurde untersucht.

7. Methode nach SHEPERD/WEST.

SHEPERD/WEST (68) führten einen neuen Indikator in die Methodik ein. Sie entwickelten die Chromatogramme mit Butanol-Essigsäure (4 Teile Butanol, 1 Teil Eisessig, 5 Teile Wasser) und besprühten mit einer Lösung von 9 Teilen 0,66 % $K_3Fe(CN)_6$ und 1 Teil 40 % Formaldehyd. Danach wurden die Chromatogramme auf 100° C erhitzt und schliesslich ins UV-Licht gehalten. Die entwickelte Fluoreszenz wurde mit dem Auge beobachtet.

Substanz	R_F -Wert	Fluoreszenzfarbe	geringste nachweisbare Menge
Dopa	0,19	gelb	1,0
Noradrenalin	0,28	türkis	0,2
Adrenalin	0,36	apfelgrün	0,4
Oxytyramin	0,39	gelb	1,0

Mit dieser Methode war eine Unterscheidung von Adrenalin und Noradrenalin nach den Angaben von SHEPERD/WEST gut möglich.

8. Methode nach WANKMÜLLER.

WANKMÜLLER (69) hat 1953 eine Methode angegeben, die verhältnismäßig wenig Zeit zur Auftrennung der Katechinamine benötigt: 1-dimensionales, aufsteigendes Chromatogramm. Schleicher-Schüll-Papier 2043 b. Entwickler: Butanol-Essigsäure (4 Teile n-Butanol, 1 Teil Eisessig, 2 Teile Wasser). Die R_F -Werte werden bei 18-19° C bestimmt. Vor dem Chromatographieren werden die Papierstreifen 12 Stunden in die mit dem Entwickler gesättigte Kammeratmosphäre gehängt. Die Laufzeit der Chromatogramme beträgt 6-7 Stunden bei einer Steighöhe von etwa 20 cm. Die Chromatogramme werden rasch bei etwa 90° C getrocknet. Als Indikator dient folgende Lösung: 0,2 g Ninhydrin + 0,6 g Eisessig + 4,6 g Aqua dest. in 95 g n-Butanol. Sofort nach dem Besprühen werden die Chromatogramme bei 140° C für einige Minuten im Trockenschrank getrocknet. Die Katechinamine werden durch die Violettfärbung mit Ninhydrin angezeigt.

Substanz	R_F -Wert	Nachweis
1-Adrenalin	0,38	Violettfärbung durch Ninhydrin, Fluoreszenz im UV-Licht
1-Noradrenalin	0,29	

Die Methode ist leider nicht spezifisch genug, da auch noch andere Amine diese Violettfärbung geben.

9. Methode nach PITKÄNEN.

1954 konnte PITKÄNEN (70) eine sehr empfindliche Methode mitteilen. Er besprühte die -mit $K_3Fe(CN)_6$ oder mit Jodlösung -oxydierten Chromatogramme mit einer starken, sauren und alkoholischen Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd. Verwendet man 0,2 % $K_3Fe(CN)_6$ als Oxydationsmittel, dann gibt Adrenalin mit p-Dimethylaminobenzaldehyd eine intensiv blaue Farbe, während Noradrenalin in eine gelbe Verbindung mit

starker gelbbrauner Fluoreszenz im UV-Licht überführt wird, die verschwindet, während schliesslich aus der gelben Verbindung ebenfalls eine blaue entsteht. Oxydiert man mit 0,001 n Jod in 0,2 m Acetatpuffer-Lösung (pH 6) und sprüht 3-5 Minuten später p-Dimethylaminobenzaldehyd auf, dann entwickeln Adrenalin und Noradrenalin sofort eine intensiv blaue Farbe. Man kann Adrenalin und Noradrenalin jedoch unterscheiden, indem man die Jod-Oxydation bei pH 3,5 durchführt, bei welchem pH nur Adrenalin oxydiert wird. Mit dieser Methode lassen sich 0,02 µg Adrenalin bzw. Noradrenalin nachweisen.

PITKÄNEN unterwarf die Chromatogramme auch der Kondensation mit Äthylendiamin (NATELSON/LUGOVOY/PINCUS, 71). Er erzielte die besten Ergebnisse, wenn er die Chromatogramme bei 100-110°C für 1/2 Stunde über Äthylendiamindampf hielt. Adrenalin und Noradrenalin wurden dabei in schwachbraune Verbindungen überführt, die im UV-Licht stark fluorescierten, und zwar Adrenalin gelbbraun und Noradrenalin gelbgrün. Als unterste Grenze liessen sich 0,4 µg Adrenalin bzw. Noradrenalin nachweisen.

10. Methode nach HÜTER.

1952 beschäftigte sich HÜTER (72) mit der Unterscheidung von Adrenalin und Noradrenalin auf Papierchromatogrammen mit Hilfe der Fluoreszenz-Analyse. Seine Methode ist einfach: 1-dimensionales, aufsteigendes Chromatogramm. 1-20 µg synthetisches 1-Adrenalin- bzw. 1-Noradrenalinhydrochlorid in gemeinsamer Lösung wurden auf Schleicher-Schüll-Papier 2043 b aufgetragen. Als Entwickler und Oxydationsmittel diente folgendes Puffersystem: 1,15 % Kaliumchlorid, 0,62 % Borsäure und 0,377 % Natriumbicarbonat in Aqua bidest. (pH 7,3). Nach 75 Minuten sind durch Oxydation die rötlichen Flecken von Adrenochrom bzw. Noradrenochrom entstanden. Die Chromatogramme werden aus der Flüssigkeitsphase herausgenommen, mit Filtrierpapier abgetupft und 5 Minuten bei 100°C im Trockenschrank getrocknet. Bei Bestrahlung im gefilterten UV-Licht erweist sich der Farbfleck als nicht einheitlich: An seiner oberen Begrenzung tritt die grüne Fluoreszenzfarbe des Adrenolutins auf; nach unten wird er durch die blaue Fluoreszenzfarbe des Noradrenolutins begrenzt.

Wird statt des Gemisches von Adrenalin und Noradrenalin die Lösung einer dieser beiden Substanzen aufgetragen, so zeigt der Farbfleck nur die grüne oder nur die blaue Fluoreszenzfarbe. Bei einer Lösung, die 20 μ g Adrenalin und 1 μ g Noradrenalin in 0,005 ccm Lösung enthält, lassen sich beide Bestandteile eindeutig im Fluoreszenzbild erkennen, ebenso auch bei 1 μ g Adrenalin mit 0,1 μ g Noradrenalin. Es fällt jedoch nur dann ein Farbunterschied auf, wenn mindestens 1 μ g Adrenalin in 0,005 ccm in der Mischung enthalten ist. Die Methode lässt in kurzer Zeit Adrenalin neben Noradrenalin in einer Mischung qualitativ, möglicherweise auch quantitativ ermitteln, wie HÜTER mitteilt. Als vorteilhaft erweist sich der Wegfall einer Färbemethode.

Zusammenfassender Überblick

Adrenalin und Noradrenalin lassen sich als Salze durch Papierchromatographie trennen. Abschliessend sei in Tabelle 3 ein Überblick über die papierchromatographischen Methoden gegeben. Die einzelnen Methoden unterscheiden sich durch die Wahl der Entwickler und Indikatoren. Zum Nachweis der Identität der untersuchten Substanzen werden Standardchromatogramme der Katechinamine herangezogen.

Die Indikatoren sind um so sicherer je spezifischer sie für die Katechinamine sind. Durch Oxydation - $K_3Fe(CN)_6$ - bzw. Jodbehandlung der entwickelten Chromatogramme - entstehen das braunrote Adrenochrom bzw. das leuchtend rote Noradrenochrom. Sehr geringe Katechinaminmengen lassen sich mit Natrium- β -naphthochinon-4-sulfonat (GLAZKO/DILL; S.38) sowie mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (PITKÄNEN; S.40) nachweisen. Ninhydrin als Indikator (WANKMÜLLER; S.40) hat sich als nicht genügend spezifisch erwiesen, da ja auch noch andere Amine mit Ninhydrin Violettfärbung geben.

Als Entwickler wurden bisher verwendet: wässriges Phenol, Butanol-Salzsäure, Butanol-Essigsäure und Butanol-Trichloressigsäure. Während v.EULER/HAMBERG (S.37) angeben, ihnen sei eine Trennung der Katechinamine mit Butanol-Salzsäure gelungen, wird dies von JAMES/KILBEY (S.37) und SCHULER/HEINRICH/BUCHS (S.37) verneint. Nach JAMES (S.35) lassen sich jeweils zwei Substanzen gut unterscheiden, wenn der

R_F -Werte um mehr als 0,1 differieren. Da der R_F -Wert vom Entwickler abhängig ist, ist der Entwickler als der beste zu bezeichnen, der die grösste Differenz zwischen den R_F -Werten von Adrenalin und Noradrenalin gibt. Obwohl JAMES/KILBEY (S.37) mit Butanol-Essigsäure und besonders Butanol-Trichloressigsäure als Entwickler eine Trennung der Katechinamine gelang, waren ihre Ergebnisse doch nicht so gut, wie die von JAMES (S.34) mit wässrigem Phenol erzielten. Als bisher günstigster Entwickler zur Trennung von Adrenalin und Noradrenalin ist daher wässriges Phenol zu nennen.

Die von JAMES (S.35) angegebenen R_F -Werte (Adrenalin 0,441; Noradrenalin 0,216) wurden auch von SCHULER/HEINRICH/BUCHS (S.36) bestätigt. Warum bei gleicher Verwendung von Butanol-Essigsäure als Entwickler die R_F -Werte nach JAMES/KILBEY (Adrenalin 0,31; Noradrenalin 0,25), nach SHEPERD/WEST (Adrenalin 0,36; Noradrenalin 0,28) und nach WANKMÜLLER (Adrenalin 0,38; Noradrenalin 0,29) nicht übereinstimmen, ist nicht bekannt.

Die meisten Methoden lassen 1 μ g Adrenalin bzw. Noradrenalin als Minimum nachweisen. Besonders empfindlich ist die Methode nach PITKÄNEN (S.40), die noch 0,02 μ g Adrenalin bzw. Noradrenalin erfasst.

Da besonders Adrenalin, aber auch Noradrenalin leicht oxydabel sind, müsste auch an einen eventuellen Verlust der Katechinamine durch Oxydation während der papierchromatographischen Trennung gedacht werden. Leider werden keine diesbezüglichen Angaben gemacht. Es wäre vor allem der Einfluss des pH, der Laufzeit der Chromatogramme und der Kammeratmosphäre (O_2 -Gehalt) zu berücksichtigen.

TABELLE 3
Papierchromatographische Methoden zur Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin

Verfasser	Entwickler	Indikator	A d r e n a l i n		N o r a d r e n a l i n			
			Farbe	geringste nachweisbare Menge	R _F -Wert	Farbe	geringste nachweisb. Menge	R _F -Wert
James (S. 34)	wässriges Phenol	K ₃ Fe(CN) ₆ pH 7,8	braunrot	-	0,441	leuchtend rot	-	
Goldenberg (S. 35)	wässriges Phenol	K ₃ Fe(CN) ₆ pH 8,3	braunrot	1 ♂	-	leuchtend rot	1 ♂	
v. Euler/Hamberg (S. 36)	Butanol-Salzsäure	K ₃ Fe(CN) ₆ pH 7,7	rot	5-10 ♂	0,25	blaurot	5-10 ♂	
James/Kilbey (S. 37)	Butanol-Eisigsäure	K ₃ Fe(CN) ₆ pH 8,3	rosarot	-	0,31	malvenfarbig	-	
	Butanol-Trichlor-essigsäure	K ₃ Fe(CN) ₆ pH 8,3	rosarot	-	0,45	malvenfarbig	-	
	wässriges Phenol	K ₃ Fe(CN) ₆ + p-Dimethylamino-benzaldehyd	intensiv blau	0,02 ♂	-	gelb	0,02 ♂	-
wässriges Phenol		Jod + p-Dimethylamind-benzaldehyd	intensiv blau	0,02 ♂	-	intensiv blau	0,02 ♂	-
Glazko/Dill (S. 38)	wässriges Phenol	Natrium- -naph-tochinon-4-sul-fonat pH 8,6	rosarot	< 1 ♂	-	intensiv blau	< 1 ♂	-
Wankmüller (S. 40)	Butanol-Eisigsäure	Ninhydrin	violett	-	0,38	violett	-	0,29
Shea (S. 39)	wässriges Phenol	UV-Licht	apfelgrüne Fluoreszenz	10 ♂	-	nicht untersucht	-	-
Shepard/West (S. 39)	Butanol-Eisigsäure	K ₃ Fe(CN) ₆ + UV-Licht	apfelgrüne Fluoreszenz	0,4 ♂	0,36	türkisfarbene Fluoreszenz	0,2 ♂	0,28
Hiltner (S. 41)	KCl-H ₃ BO ₃ -NaHCO ₃ -Gemisch als Entwickler und Indikator pH 7,3 + UV-Licht		braunroter Fleck bzw. grüne Fluor.	1 ♂ Adr. kann neben 0,1 ♂ Noradrenalin nachgewiesen werden		roter Fleck bzw. blaue Fluoreszenz	1 ♂ Adr. kann neben 0,1 ♂ Noradrenalin nachgewiesen werden	
Pirkänen (S. 40)	wässriges Phenol	Kondensation m. Äthylendiamin	gelbbraune Fluoreszenz	0,4 ♂	-	gelbgrüne Fluoreszenz	0,4 ♂	-

D. Fluorimetrische Bestimmungsmethoden

Im allgemeinen wird PAGET (1930) (73) als der Entdecker der Fluoreszenzreaktion des Adrenalins angesehen. Doch schon LOEW (1918) (74) erwähnt, dass Adrenalin mit starkem Alkali Fluoreszenz entwickelt. BARKER et al. (1932) (75) zeigten, dass diese Methode "empfindlich, spezifisch und qualitativ" ist; eine quantitative Bestimmung gelang ihnen noch nicht. Genauer wurde die Adrenalinfluoreszenz von GADDUM/SCHILD (1934) (76) untersucht. Nach ihren Angaben bewirkt Zusatz einiger Tropfen 5 n NaOH zu Verdünnungen von Adrenalin bis $1:10^8$ im UV-Licht apfelgrüne, für Adrenalin charakteristische Fluoreszenz. Da sich mit der Methode so geringe Adrenalinkonzentrationen erfassen lassen, lag der Versuch nahe, ob sich die Fluoreszenzreaktion des Adrenalins nicht zur qualitativen und dann auch quantitativen Bestimmung der Adrenalinkonzentration im menschlichen Blut heranziehen liesse und ob etwa krankhafte Veränderungen des Adrenalin-Blutspiegels erfassbar wären. GADDUM/SCHILD (76) sowie TIEG (1934) (77) versuchten, die Fluoreszenzreaktion im Blut oder Serum auszuführen, hatten jedoch keinen Erfolg, da störende Nebenfluoreszenzen auftraten. In gleicher Weise fanden KONZETT/WEISS (1939) (78) aus folgenden Gründen die Methode ungeeignet zur quantitativen Adrenalinbestimmung im Blut: Solange sie Lösungen untersuchten, war die Methode empfindlich und spezifisch. Wurden die Untersuchungen jedoch am Blutplasma oder -serum durchgeführt, dann wurde die apfelgrüne Fluoreszenz von einer gleichzeitig auftretenden blauen Fluoreszenz gestört, die von anderen Substanzen - wohl den Plasmaproteinen - herrührte. Es galt nun die Nebenfluoreszenzen im Blut auszuschalten, um die spezifische Fluoreszenz messen zu können. GADDUM/SCHILD fällten die Plasmaproteine mit Trichloressigsäure oder Metaphosphorsäure; dabei wurde jedoch der grösste Teil des Adrenalins mitgerissen und mit den Nebenfluoreszenzen verschwand auch die Adrenalinfluoreszenz. In der Folgezeit wurden zwei Wege beschritten, um die störenden Nebenfluoreszenzen auszuschalten.

1. Methode nach JØRGENSEN.

Den ersten Weg ging v.HUEBER (1940) (79), indem er Blut gegen Aqua dest. dialysierte und im Dialysat die Fluoreszenzreaktion anstellte. Da er im Dialysat eine Substanz nachweisen konnte, die bei Zugabe von Alkali eine apfelgrüne Fluoreszenz entwickelte, hielt er diese Substanz für Adrenalin. Er verglich die Fluoreszenz des Dialysates mit der bekannter Adrenalinlösungen und glaubte, so den Adrenalingehalt des Blutes bestimmt zu haben. KALAJA/SAVOLAINEN (1941) (80) veröffentlichten eine Modifikation der v.HUEBERSchen Methode. Sie arbeiteten ebenfalls mit der Dialyse. Wegen der Labilität des Adrenalins verwendeten sie jedoch einen HCl-Glykokoll-Puffer (pH 4) als aufnehmende Flüssigkeit. Von KALAJA/SAVOLAINEN hat dann JØRGENSEN (81) die Methode fast unverändert übernommen.

Methodik:

5 ccm Citratblut werden mit der gleichen Menge eines HCl-Glykokoll-Puffers (pH 4) versetzt und während 4 Stunden unter Schütteln gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die Dialysierflüssigkeit enthält einen Zusatz von Aluminiumhydroxyd nach SHAW (1938) (28), das bei pH 4 wohl die störenden Nebenfluoreszenzen, die noch in geringer Masse im Dialysat auftreten, nicht aber das Adrenalin absorbiert (vgl. LUND S.). Nach Zusatz von 0,3 ccm 2 n NaOH zu 2 ccm Dialysat wird im UV-Licht einer Quecksilberdampfampe die entstehende Fluoreszenz mit derjenigen einer Eosinlösung verglichen. Der Fluoreszenzvergleich erfolgt durch sog. Fluoreszenztitration, d.h. es wird vor der UV-Lichtquelle so lange eine Eosinlösung von 0,1 mg% tropfenweise zugesetzt, bis die Fluoreszenzen von Adrenalin- und Eosinlösung gleich hell erscheinen. Die Ablesung der Fluoreszenz muss genau 1 Minute nach der Zugabe von Alkali erfolgen. Als Minimum lässt sich 1 $\frac{1}{8}$ % erfassen. JØRGENSEN gibt als Durchschnittswert für venöses Blut eine Adrenalinkonzentration von 6,8 $\frac{1}{100000}$ % ($\approx 0,068 \frac{1}{100000}$ ccm) an.

BLOCH (1948) (82) hat die Methode von JØRGENSEN nachgeprüft und schreibt dazu: Die Fluoreszenztitration ist mit bedeutenden Fehlern behaftet. Eosin hat nicht den gleichen Fluoreszenzfarbton wie das Fluoreszenzprodukt des Adrenalins, was den Helligkeitsvergleich sehr unsicher macht. Dazu ist der Vergleich von Fluoreszenzintensitäten kleiner Flüs-

sigkeitsmengen in Reagenzgläsern mit blossen Auge grossen subjektiven Fehlern unterworfen. Bei JØRGENSEN entsprechen 0,05 ccm Eosinlösung 1 $\frac{1}{1000}$ % Adrenalin. Eine Unsicherheit von nur 2 Tropfen Eosin, wie sie bei der Beurteilung mit blossen Auge leicht vorkommen kann, ergibt schon ganz erhebliche Fehler. JØRGENSEN bestimmt das Maximum der Adrenalinfluoreszenz jeweils 1 Minute nach der Zugabe von Alkali. Da sich jedoch das zeitliche Auftreten des Maximums mit der Adrenalinkonzentration ändert, liegen auch hier Fehlerquellen. BLOCH war es nicht möglich, im Dialysat die typische Adrenalinfluoreszenz nachzuweisen. Er urteilt daher in Übereinstimmung mit v. PORAT (1946) (83), dass mit der Methode nach JØRGENSEN die Adrenalinbestimmung im Blute nicht möglich sei und meint: "umso erstaunlicher erscheint es, dass von JØRGENSEN (ohne Mitteilungen über die Streubreite der Methode) Adrenalin-konzentrationen von einigen $\frac{1}{1000}$ % im Blute auf Bruchteile von $\frac{1}{1000}$ % genau angegeben werden."

2. Methode nach LEHMANN/MICHAELIS.

Den zweiten Weg schlugen LEHMANN/MICHAELIS (1941) (84-87) ein. Von der Überlegung ausgehend, dass bei der Säurefällung der Plasmaproteine grosse Mengen des Adrenalins mitentfernt werden und bei der Methode nach JØRGENSEN nur ein geringer Teil des Adrenalins in das Dialysat übertreten könnte, setzten sie sich das Ziel, den Adrenalinhalt des unveränderten Plasmas zu bestimmen.

Methodik:

LEHMANN/MICHAELIS verwendeten zur fluorimetrischen Bestimmung ein Pulfrich-Photometer und verglichen die auftretende Fluoreszenz mit der eines Glasstandards (Schott BG 26, grünfluoreszierendes Glasstück). Der Glasstandard hat gegenüber fluoreszierenden Lösungen den Vorteil der Konstanz. Als erste isolierten LEHMANN/MICHAELIS die apfelgrüne Adrenalinfluoreszenz mit einem optischen Filter (sog. Filter C), das wohl die Adrenalinfluoreszenz durchlässt, die "Eigenfluoreszenz" des Plasmas aber ausschneidet. Diese Neuerung in der Messmethodik erwies sich als sehr glücklich und nützlich und wurde später von vielen Autoren übernommen. Von einer UV-Lichtquelle (Hanauer Analysen-

Quarzlampe) fällt UV-Licht auf die Messkuvette, die die Lösung, deren Fluoreszenz bestimmt werden soll, enthält. Zwischen Messkuvette und Pulfrich-Photometer befindet sich Filter C (Schott GG 14, schneidet den kurzwelligen Teil des Spektrums bis etwa 500 m μ ab). Da das Schott GG 14 - Filter im UV-Licht rot fluoresciert, setzen LEHMANN/MICHAELIS zwischen Messkuvette und Filter C ein Filter B, und zwar ein Schott GG 13 - Filter, das mit Sicherheit alle UV-Strahlen zurückhält und so das Filter C schützt. Nun wird zuerst die Fluoreszenz des unveränderten Plasmas bestimmt. Diese besteht aus Adrenalinfluoreszenz und Eigenfluoreszenz des Plasmas. Da das Schott GG 14 - Filter nicht die gesamte Eigenfluoreszenz des Plasmas wegschneidet, wird nun zum Plasma Formaldehyd gegeben, der wohl die Adrenalinfluoreszenz, jedoch nicht die Eigenfluoreszenz des Plasmas zerstört; danach wird zum zweiten Male abgelesen. Aus der Differenz dieser beiden Ablesungen ergibt sich der Wert, der auf die Adrenalinfluoreszenz zurückzuführen ist. Die Adrenalinfluoreszenz wird nach LEHMANN/MICHAELIS durch Eisen und andere Schwermetalle herabgesetzt. Zur Ausschaltung dieses Fehlers wird eine dritte Messung in der gleichen Plasmaprobe ausgeführt unter Zusatz eines fluoreszierenden Stoffes, dessen Fluoreszenzminderung durch die Störsubstanzen für die Lage der Adrenalinfluoreszenzkurve kennzeichnend ist. Als Zusatz diene Adrenalin in einer Konzentration von 50 μ /ccm. Aus den Werten der drei durchgeführten Ablesungen ergibt sich eine einfache Formel zur Berechnung des Adrenalingehaltes:

$$\frac{\text{Wert I} - \text{Wert II}}{\text{Wert III} - \text{Wert II}} \cdot K \text{ (}\mu\text{/ccm)}.$$

Als normaler Adrenalingehalt im menschlichen venösen Blut werden von LEHMANN/MICHAELIS 1,0 - 3,16 μ /ccm Plasma angegeben (86).

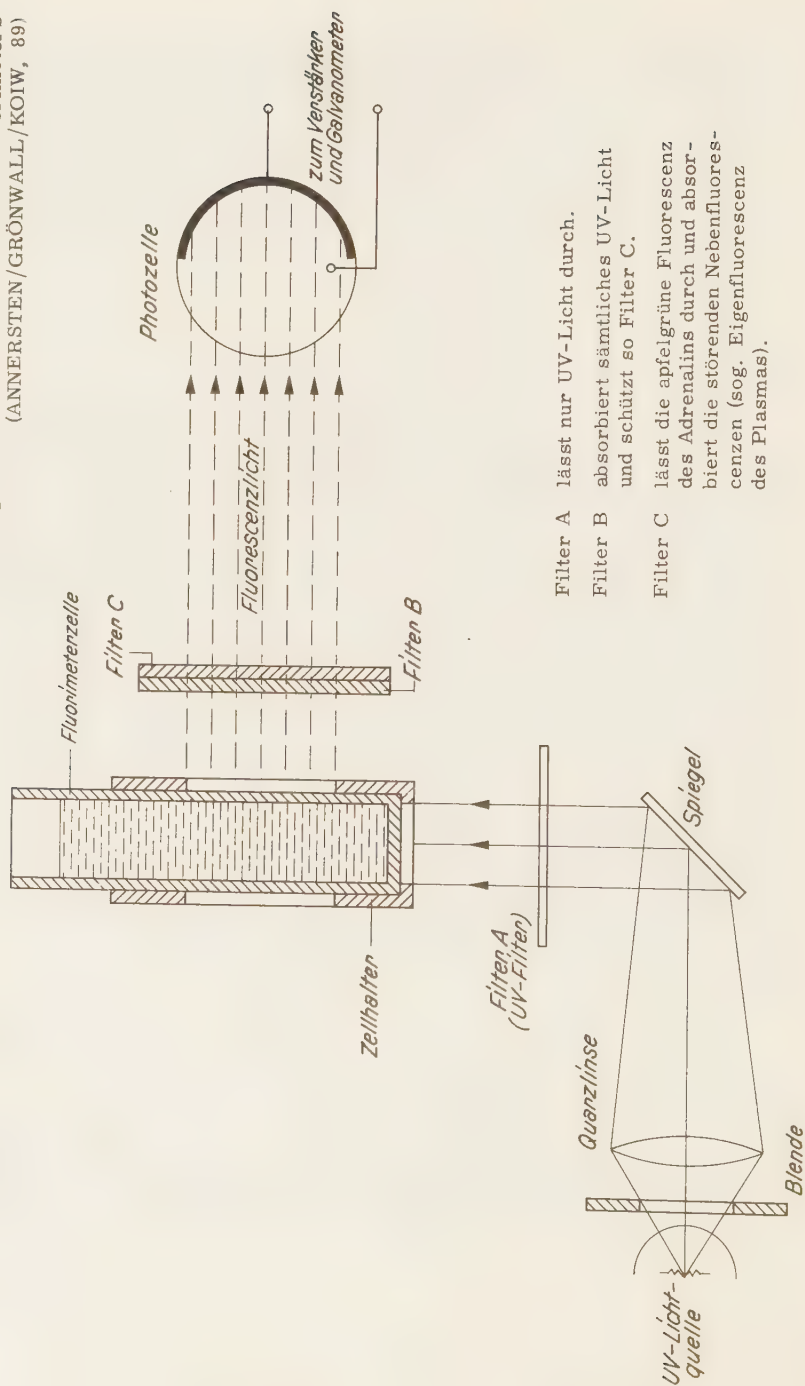
STAUB/KLINGLER (88) übten an der Methode von LEHMANN/MICHAELIS Kritik: Einerseits stimme die Fluoreszenz des Glasstandards nicht genau mit der Farbe der Adrenalinfluoreszenz überein, andererseits trete das Fluoreszenzmaximum nicht -wie von LEHMANN/MICHAELIS angegeben- nach 10-20 sec., sondern erst nach etwa 1 min. auf. Ferner sei das Absinken des Fluoreszenzwertes nach Zugabe von Formaldehyd zum Plasma lediglich auf die durch die Formaldehydzugabe gesetzte Verdünnung zurückzuführen und nicht auf eine Zerstörung der Adrenalinfluoreszenz.

Auch sei es zwecklos, die Messgenauigkeit durch eine Ablesung III erhöhen zu wollen, da schon allein aus den Ablesungen I und II ein Fehler von etwa 15 % zu erwarten wäre. Adrenalin lasse sich daher mit dieser Methode nicht mit Sicherheit im Plasma nachweisen. v. PORAT (83) versuchte ebenfalls erfolglos die Methode von LEHMANN/MICHAELIS zu wiederholen und er berichtet: "Es gelang mir nicht, mit dieser Methode Adrenalin im Plasma nachzuweisen."

3. Methode nach ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW.

Die negative Kritik der genannten Autoren an der Methode von LEHMANN-MICHAELIS und die negative Kritik BLOCHs an der Methode von JØRGENSEN veranlassten ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW (1949) (89), die Methode von LEHMANN/MICHAELIS zu verbessern und so abzuändern, dass -nach Angabe der Autoren- der Adrenalingehalt des Plasmas und auch der von Blutdialysaten bestimmt werden konnte. ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW erhöhten die Empfindlichkeit der fluorimetrischen Adrenalinbestimmung, indem sie die Intensität der Fluoreszenz über eine Photozelle mit Verstärker, der an ein Galvanometer angeschlossen war, aufzeichneten. Auf diese Weise wurde die Empfindlichkeit der Reaktion beträchtlich erhöht und die subjektiven und objektiven Fehlerquellen, die sich beim Vergleichen der Adrenalinfluoreszenz mit Standardfluoreszenzen (Eosinstandard bzw. Glasstandard) ergeben, ausgeschaltet. In späterer Zeit wurde von anderen Autoren im Prinzip immer wieder das gleiche Fluorimeter zur Bestimmung der Adrenalinfluoreszenz herangezogen, das ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW angegeben haben. Es sei daher in Fig. 1 das Schema dieses Fluorimeters gezeichnet.

Figur 1: Schema des verwendeten Fluorimeters
(ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW, 89)



Methodik:

- a) Reagentien: 10% NaOH Lösung
 40% Formaldehydlösung
 Adrenalinlösung 50 μ g/ccm in 1,5% Natriumthiosulfat
 "Schutzlösung" für Blut: 1 g Natriumcitrat und 3 g Natriumthiosulfat in 100 ccm Aqua bidest.
- b) Fluorimeter: Beckmann-Spektrophotometer mit "Fluoreszenz-Zusatzgerät" = (Photozelle + Verstärker + Galvanometer)
 Filter A = einfacher UV-Filter.
 Filter B = Schott GG 13,
 Filter C = Schott BB 14.

c) Bestimmung des Adrenalingehaltes im Blutplasma:

In ein geeichtes Reagenzglas werden 1,5 ccm der Schutzlösung gegeben, in die hinein direkt 4,5 ccm venöses Blut punktiert werden. Die Mischung wird zentrifugiert und das Plasma in ein Reagenzglas abpipetiert, in dem es 5 Minuten geschüttelt wird, um mit Luftsauerstoff gesättigt zu werden. Dann wird 1 ccm der Plasma-Lösung in die Fluorimeterzelle überführt und 2 ccm 10% NaOH werden zugegeben, mit Glasstab umrühren. Die Fluorimeterzelle wird sofort in das Fluorimeter eingesetzt und das Maximum der Fluoreszenz beobachtet und abgelesen (Wert I). Darauf werden 0,1 ccm 40 % Formaldehyd zugegeben, mit Glasstab umrühren. Die Fluorimeterzelle bleibt 5 Minuten im dunklen Fluorimeter, dann wird die Fluoreszenz erneut bestimmt (Wert II). Der Formaldehyd hat die Fluoreszenz des Adrenalins zerstört und nur noch die Fluoreszenz der Proteine, die Filter C passieren konnte, erreicht die Photozelle und wird gemessen. Schliesslich werden 0,1 ccm einer frischen Adrenalinstandardlösung (50 μ g/ccm) zum Inhalt der Fluorimeterzelle gegeben. Mit Glasstab umrühren und Maximum der Fluoreszenz ablesen (Wert III).

Die Berechnung des Adrenalingehaltes der zu untersuchenden Lösung wird durch die Tatsache erschwert, dass die Fluoreszenz ersterer nicht unter gleichen Bedingungen gemessen wird, wie die Fluoreszenz der

Adrenalin-Standardlösung. Wird doch bei Wert I die Adrenalin-Fluoreszenz in Abwesenheit von Formaldehyd bestimmt, bei Wert III aber in Gegenwart von Formaldehyd, der für die Ablesung von Wert II nötig war. Da die Fluoreszenz des Adrenalins durch Formaldehyd zerstört wird, gibt die Ablesung Wert III einen niedrigeren Adrenalinwert als den tatsächlichen an; denn der überschüssige Formaldehyd zerstört einen Teil der Adrenalinstandardlösung. Man muss daher experimentell den Faktor bestimmen, mit dem man den Quotienten

$$\frac{\text{Fluoreszenz der unbekannten Lösung}}{\text{Fluoreszenz der bekannten Lösung}} = \frac{\text{Wert I} - \text{Wert II}}{\text{Wert III} - \text{Wert II}}$$

multiplizieren muss, damit man die genaue AdrenalinKonzentration der unbekannten Lösung erhält. Für nach dieser Methode behandeltes Blut (Plasma) beträgt der Faktor K 1,36. Die AdrenalinKonzentration ergibt sich also aus folgender Gleichung:

$$\frac{\text{Wert I} - \text{Wert II}}{\text{Wert III} - \text{Wert II}} \cdot K \quad (\mu\text{-/ccm})$$

Ein Beispiel sei gegeben: Wert I = 34,8 Zeigerwerte
Wert II = 26,1 Zeigerwerte
Wert III = 30,2 Zeigerwerte

$$\frac{34,8 - 26,1}{30,2 - 26,1} \cdot 1,36 = 2,9 \mu\text{-/ccm Adrenalin.}$$

Nach den Angaben der Autoren misst die Methode die Adrenalinfluoreszenz und ist spezifisch. Die Fluoreszenz des Noradrenalins erreicht ebenfalls ein Maximum (WEST 1947) (90), doch viel langsamer und nur bei höherer Konzentration. Es wäre daher möglich, dass bei dieser Methode ein kleiner Teil der gemessenen Fluoreszenz dem Noradrenalin zuzuschreiben wäre.

Die Empfindlichkeit der Methode ist so hoch, dass sich das Adrenalin im Plasma und im Dialysat des Plasmas bestimmen lässt. Die Dialyse wurde nach JØRGENSEN durchgeführt. Im Dialysat fanden sich 0,031-0,082 $\mu\text{-/ccm}$ Adrenalin (2,5 - 3,1 %), im nicht dialysierten Plasma blieben 1,13 - 2,91 $\mu\text{-/ccm}$ Adrenalin (97%) zurück. Der Adrenalinegehalt des

Plasmas vor der Dialyse betrug 1,17 - 3,3 μ /ccm. Blutproben, die gleichzeitig rechts und links entnommen wurden, stimmten in ihrem Adrenalin-gehalt gut überein. Die erhaltenen Ergebnisse erklären den Unterschied zwischen den hohen Werten von LEHMANN/MICHAELIS (Adrenalin im Plasma bestimmt) und den niedrigen Werten von v. HUEBER, KALAJA/SAVOLAINEN, JØRGENSEN und WEST (90) (im Dialysat bestimmt) sowohl prinzipiell als auch quantitativ. Die Autoren meinen nunmehr sagen zu können, dass nur ein geringer Teil des Adrenalins im Plasma in freier Form vorliegt (2,5 - 3,1 %, im Dialysat), der Hauptteil des Adrenalins aber in -wahrscheinlich an Proteine- gebundener Form (97%, im nicht dialysierten Plasma). Die Versuche und Ergebnisse dieser Methode lassen sich wiederholen.

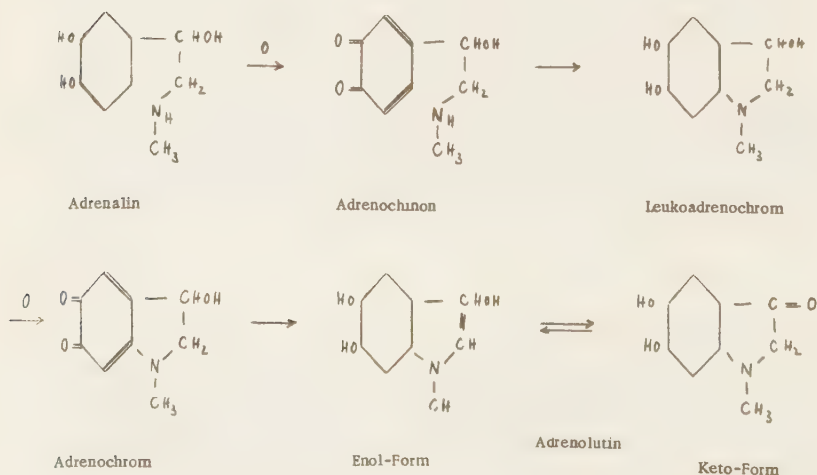
ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW untersuchten noch den Einfluss des Formaldehyds auf die Adrenalin-Standardpräparate verschiedener Firmen. Sie mussten feststellen, dass der Formaldehyd auf die verschiedenen Standardpräparate einen mehr oder minder grossen Einfluss hat. Daher ist die Adrenalinfluoreszenz bei Verwendung verschiedener Standardpräparate nicht gleich. Durch Zufall ist das von ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW verwendete Standardpräparat ("Original Adrenalin" 1:1000 der Fa. Parke, David & Co., Detroit USA) das günstigste, da hier die Adrenalinfluoreszenz durch den überschüssigen Formaldehyd die geringste Abschwächung erfährt. Infolgedessen unterscheidet sich Wert III gut von Wert II. Es gibt jedoch Adrenalinstandardpräparate, bei deren Verwendung der Wert III gleich dem Wert II oder nur gering höher als dieser ist. Die Verwendung solch ungünstiger Standardpräparate könnte neben zu geringer Empfindlichkeit der Fluorimeter die Misserfolge von v. PORAT (83) und von STAUB/KLINGLER (88) erklären. Für reproduzierbare Versuche müsste daher immer das gleiche Adrenalinstandardpräparat gefordert werden.

4. Methode nach LUND.

a) Bestimmung von Adrenalin.

1949 beschäftigte sich LUND (91-93) in mehreren Arbeiten mit der fluorimetrischen Bestimmung des Adrenalins. Da LUND sich sehr der theoretischen Seite der fluorimetrischen Bestimmung des Adrenalins widmete, sei hier der Chemismus der Adrenalinfluoreszenz, soweit er bekannt ist, abgehandelt.

Wie schon früher ausgeführt, entwickeln schwache Adrenalinlösungen bei Zugabe von starkem Alkali in Gegenwart von Sauerstoff eine apfelgrüne Fluoreszenz. Zur Überführung des Adrenalins in die fluoreszierende Substanz sind pro Mol Adrenalin 2 Atome Sauerstoff nötig. Wird der Sauerstoff durch Hindurchblasen von CO_2 (GADDUM/SCHILD) (76) oder von N_2 (JØRGENSEN) (81) entfernt, dann tritt bei Zugabe von Alkali keine Fluoreszenz auf. 1945 hatte JØRGENSEN beobachtet, dass die Adrenalinfluoreszenzkurve den Kurven ähnelt, die aus den sog. "gekoppelten Reaktionen" resultieren, bei denen zwei entgegengesetzte Reaktionen ablaufen. Er vermutete daher, dass die Adrenalin-Fluoreszenzkurve die Bildung und Zerstörung des Adrenalin-Fluoreszenzproduktes anzeigen könnte. LUND konnte diese Vermutung bestätigen, indem er zeigte, dass das Erscheinen der Adrenalinfluoreszenz das Ergebnis zweier gleichzeitiger, aber gegenläufiger Reaktionen ist: des oxydativen Auf- und Abbaues des fluoreszierenden Adrenalinproduktes. Schliesslich gelang es LUND, die fluoreszierende Substanz -die er "Adrenolutin" nannte- zu kristallisieren (91) und als 1-methyl-3,5,6-Trioxindol zu identifizieren (92). Die Konstitutionsformel des Adrenolutins wurde gleichzeitig und unabhängig auch von EHRLÉN (94) gefunden und dann von FISCHER (95, 96) bestätigt. Die Entstehung des Adrenolutins lässt sich wie folgt formulieren:



Das Adrenalin wird durch den Luftsauerstoff zu Adrenochrom oxydiert. Durch Zugabe von Alkali wird das Adrenochrom ohne Sauerstoff in Adrenolutin umgewandelt. Nach 1-3 Minuten erreicht die gelbgrüne Fluoreszenz ihr Maximum und schwindet dann wieder, da der überschüssige Sauerstoff das Adrenolutin oxydativ zerstört. Zur Zeit des Fluoreszenzmaximums liegt nur $\frac{1}{4}$ des vorhandenen Adrenalins als Adrenolutin vor. Während Adrenochrom in neutraler und schwach saurer Lösung gegen Oxydation mit Sauerstoff ziemlich resistent ist, wird Adrenolutin ungeachtet der Acidität sehr leicht oxydiert.

Auf diesen Tatsachen aufbauend, verbesserte LUND (93) die Empfindlichkeit und Messmethodik der fluorimetrischen Adrenalinbestimmung. Es leitete ihn folgender Gedankengang: Man müsste das Adrenalin quantitativ in neutraler oder schwach saurer Lösung zu Adrenochrom oxydieren und dann das Adrenochrom unter entsprechenden sauerstofffreien Bedingungen in Adrenolution überführen. Als bestes Oxydationsmittel erwies sich MnO_2 . Schüttelt man eine Adrenalinlösung mit MnO_2 , dann wird das Adrenalin rasch quantitativ in saurem und neutralem pH (3-8) zu Adrenochrom oxydiert. Die Oxydation des Adrenalins zu Adrenochrom ist nach 15-30 Sekunden vollendet und das so entstandene Adrenochrom wird nicht vor 2-3 Minuten weiter oxydiert. Durch Zugabe von starkem Alkali wird das Adrenochrom in Adrenolutin umgewandelt. Um die Fluoreszenzintensität genau messen zu können, muss aller Sauerstoff aus der Lösung entfernt werden, weil sonst das Adrenolutin in alkalischer Lösung sofort oxydativ abgebaut wird. Am besten liess sich der Sauerstoff mit Ascorbinsäure entfernen, da Natriumascorbat eine grössere Sauerstoffaffinität besitzt als Adrenolutin. Gibt man zu 10 ccm Adrenochromlösung 1 ccm NaOH Lösung, die vorher mit 0,2 ccm einer 1 % Ascorbinsäurelösung versetzt wurde, dann wird das Adrenochrom quantitativ und fast sofort in Adrenolutin umgewandelt. Die Fluoreszenz hält dann wenigstens 1 Stunde an. (Versuche haben gezeigt, dass die Fluoreszenzintensität abgeschwächt wird, sobald man 4 mg oder mehr Ascorbinsäure zugibt. Ascorbinsäure hat also in höherer Konzentration eine Fluoreszenzschwächende Wirkung. Dies dürfte auf folgende Tatsache zurückzuführen sein: Ascorbinsäure reduziert die Intensität des erregenden UV-Lichtes, indem sie UV-Licht absorbiert.)

Methodik:

a) Fluorimeter:

Coleman Photofluorimeter, Modell 12b, Quecksilberdampfampe als UV-Lichtquelle. Filter A = Schott UG 2 (maximale Transmission bei 365 m μ). Filter C = Corning 3486 (lässt kein Licht unter 500 m μ durch). Vakuum-photozelle, elektronischer Verstärker, Galvanometer. Als Eichlösung wird eine Chinin-Sulfat-Standardlösung verwendet (10-20 $\times$ % in 0,1 n H₂SO₄). Die Fluoreszenzwerte werden nach Abzug der entsprechenden Leerfluoreszenzen erhalten.

Verwendet man als Filter A ein Schott BG 12 (maximale Transmission bei 400 m μ), dann wird die Empfindlichkeit auf das drei- bis vierfache gesteigert. Dies erklärt sich wie folgt: Die Adrenalinmoleküle vermögen, wenn sie mit 400 m μ erregt werden, eine weit grössere Menge Strahlungsenergie zu absorbieren, als wenn sie mit 365 m μ erregt werden. Entsprechend können sie auch mehr Fluoreszenzlicht emittieren. - Die eingangs beschriebene Umwandlung sämtlichen Adrenochroms in Adrenolutin hat die Empfindlichkeit nochmal um etwa das vierfache erhöht.

b) Isolierung des Adrenalins aus dem Blut:

Nachdem bei der Dialyse des Plasmas nur ein sehr geringer Teil des Adrenalins erfasst wird und nachdem die Fällung der Plasmaproteine einen beachtlichen Verlust an Adrenalin mit sich bringt, kam LUND der Gedanke, man könnte das Adrenalin aus dem Blut isolieren und dann als Adrenalinlösung bestimmen. LUND griff dabei auf die Angaben SHAWS (1938) (28) zurück, der Adrenalin an Aluminiumhydroxyd adsorbierte. Um zu erfahren, ob Adrenalin vollständig an Aluminiumhydroxyd adsorbiert wird, stellte LUND eine Reihe Versuche an, in denen er den Einfluss des pH auf die Adrenalin-Adsorption prüfte. Die Ergebnisse können aus Fig.2 abgelesen werden. 9 ccm einer 0,2 n Pufferlösung (Phosphat oder Acetat) und 10 ccm einer 10 $\times$ % Adrenalinlösung wurden zu 1 ccm einer Suspension von Al (OH)₃ gegeben. 2 Minuten schütteln und zentrifugieren. Das Adrenalin wird in der überstehenden Flüssigkeit fluorimetrisch nach der Methode von LUND bestimmt.

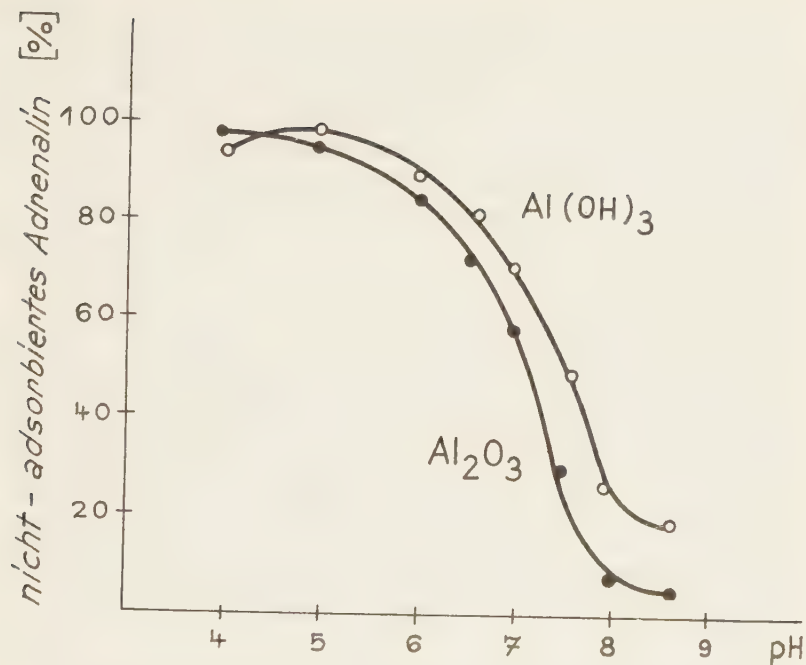


Fig.2 Einfluss der Acidität auf die Adsorption von Adrenalin an Aluminiumoxyd und Aluminiumhydroxyd (LUND) (93).

Keine Adsorption von Adrenalin an $\text{Al}(\text{OH})_3$ findet statt im Bereich zwischen pH 4 und 5. Dann nimmt mit steigendem pH-Wert die Adrenalin-Adsorption zu. Jedoch auch bei einem pH von 8-9 findet keine vollständige Adsorption statt. Mit Al_2O_3 (für chromatographische Zwecke, British Drug Houses) anstelle von $\text{Al}(\text{OH})_3$ konnte eine ähnliche Abhängigkeit der Adrenalin-Adsorption vom pH der Lösung festgestellt werden; die Adsorption an Al_2O_3 war vollständiger bei alkalischer Reaktion. So wurden bei pH 8,4 94% des zugefügten Adrenalins adsorbiert. Aus diesem Grunde entschloss sich LUND Al_2O_3 zur Adsorption des Adrenalins zu verwenden. Er schickte Adrenalinlösungen mit 0,2 n Natriumacetat durch eine Aluminiumoxydsäule. Dann wird die Säule mit 0,2 n Natriumacetat nachbehandelt, um das pH möglichst günstig für die Ad-

sorption zu gestalten. Es folgt Elution des Adrenalins mit 0,2 n Essigsäure, wobei 92% des zugefügten Adrenalins wiedergefunden werden.

Wurde Natriumbicarbonat statt Natriumacetat verwendet, dann konnten nur 70% des zugefügten Adrenalins im Eluat nachgewiesen werden, obwohl das alkalische Filtrat (pH 8,9) kein Adrenalin enthielt. Dieser Adrenalinverlust beruht wohl auf einer Oxydation der alkalischen Adrenalinlösung. Offenbar kollidiert die Notwendigkeit, die Alkalinität in solchen Grenzen zu halten, dass das Adrenalin während der Adsorption nicht oxidiert wird, mit der Notwendigkeit, dass man das günstigste pH für die Adrenalin-Adsorption einstellen muss.

Diese Adsorptionsmethode mit anschließender Elution des Adrenalins wurde an Serum, Plasma und haemolysiertem Blut ausprobiert. Protein und Haemoglobin liefen durch die Aluminiumoxydsäule, während das zugefügte Adrenalin fast vollständig adsorbiert wurde. Elution mit Essigsäure ergab ein farbloses, proteinfreies Eluat, in dem konstant 80% des zugefügten Adrenalins wiedergefunden wurden. (Es wurden 0,1 - 1 μ g-Adrenalin in 5 ccm Plasma gegeben, das entspricht 2-20 μ g-%). Da der Verlust durch Oxydation unabhängig von der Adrenalinkonzentration im Plasma immer 20% betrug, erscheint es gerechtfertigt, den gefundenen Wert der Adrenalinkonzentration mit 1,25 zu multiplizieren, um den wirklichen Wert zu erhalten.

c) Genaue Methodik:

1. Aus dem mit Heparin versetzten Blut werden die Blutkörperchen abzentrifugiert.
2. 1 g Al_2O_3 (British Drug Houses) wird in ein Glasröhrchen mit 7 mm Durchmesser gefüllt. Die Säule wird mit Wasser gewaschen (20-30 ccm), bis das Filtrat fluoreszenzfrei ist.
3. 5 ccm 0,2 n Natriumacetat werden durch die Säule gesaugt, danach eine Mischung von 5 ccm Plasma (Serum, haemolysiertem Blut) mit 5 ccm 0,2 n Natriumacetat. Das Durchlaufen muss so schnell als möglich von starten gehen, um eine Oxydation des Adrenalins zu vermeiden. Die Mischung von Natriumacetat und Plasma soll nicht länger als 10 Minuten stehen. Danach wird die Säule nochmals mit 5 ccm 0,2 n Natriumacetat gewaschen.

4. Eluiert wird mit 10 ccm 0,2 n Essigsäure und 10 ccm Wasser. Das Eluat wird in einer 20 ccm Flasche gesammelt, die dann bis zum Volumenstrich mit Wasser aufgefüllt wird.
5. 0,1 g fluoreszenzfreies MnO_2 wird in je 2 Zentrifugierröhrchen gegeben, die 9 ccm des Eluates enthalten. Die Röhrchen werden 1 Minute geschüttelt, das Sediment wird wegzentrifugiert (für 30 Sekunden bei 3000 U/min.) Die Lösung wird durch fluoreszenzfreies Filtrierpapier gefiltert.
6. Zweimal 8 ccm des Filtrates - als A und B bezeichnet - werden in 2 Kuvetten pipettiert.
 Zu A werden 0,84 ccm 20 % NaOH gegeben. Dabei wird das Adrenochrom in Adrenolutin umgewandelt, letzteres aber innerhalb von 2-3 Minuten vollständig oxydativ abgebaut. 5 Minuten nach Zugabe des Alkalis werden 0,16 ccm einer 1 % Ascorbinsäurelösung der abgeblassten "Leerlösung" zugesetzt.
 Zu B wird eine Mischung von 0,84 ccm 20% NaOH mit 0,16 ccm 1 % Ascorbinsäurelösung gegeben. Das Adrenochrom wird sofort in das fluoreszierende Adrenolutin umgewandelt, dessen oxydativer Abbau durch die gleichzeitige Anwesenheit von Ascorbinsäure verhindert wird.
 Die Lösungen A und B sind nun exakt gleich, ausgenommen dass die Adrenolutinfluoreszenz in A durch Oxydation zerstört wurde, sodass A den Leerwert (die Leerfluoreszenz) für B angibt.
7. Messung der Fluoreszenz:
 - a) Das Fluorimeter wird mit Chinin-Sulfat-Lösung (10-20 μg in 0,1 $\text{N H}_2\text{SO}_4$) geeicht.
 - b) Die Fluoreszenzwerte für A und B werden gemessen.
 - c) Der Apparat wird erneut geeicht und die Ablesungen von b) werden wiederholt. Die AdrenalinKonzentration ergibt sich aus der Differenz B-A und den entsprechenden Werten der Eichkurve. Die gefundenen Werte werden - gemäss dem 20% Adrenalinverlust bei der Adsorption und Elution - mit 1,25 multipliziert und so die tatsächlichen Adrenalinwerte erhalten.

Fehlergrenze der Methode:

Plasmen, die 10-20 $\mu\%$ Adrenalin enthalten, können mit einer Genauigkeit von $\pm 5\%$ bestimmt werden; Plasmen die 1-10 $\mu\%$ Adrenalin enthalten, mit einer Genauigkeit von $\pm 10\%$. Konzentrationen unter 0,5 $\mu\%$ Adrenalin können nicht mit Sicherheit bestimmt werden, da der Fluoreszenzwert derartig geringer Konzentrationen nur einen Teil des Wertes beträgt, den schon die Leerlösung gibt.

b) Bestimmung von Adrenalin neben Noradrenalin.

Mit der Entdeckung des Noradrenalins als humoralen Überträgerstoffes des sympathischen Nervensystems (v. EULER 1946/48) (1, 2, 3) und als zweiten Hormons des Nebennierenmarkes, aus dem es zusammen mit Adrenalin nach nervöser Reizung abgegeben wird (BÜLBRING/BURN 1949 (4); PEART 1949 (5)), rückte auch die Noradrenalinbestimmung in den Vordergrund. LUND dehnte daher 1950 (97) sein Verfahren auf die gleichzeitige Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin im Blut aus.

Noradrenalin verhält sich wie Adrenalin: es wird bei pH 8,5 quantitativ an Al_2O_3 adsorbiert und lässt sich daraus zu 80% mit Essigsäure eluieren. Mit MnO_2 wird Noradrenalin zu Noradrenochrom oxydiert, das durch Zugabe von NaOH zu Noradrenolutin umgewandelt wird. Dabei muss man die oxydative Zerstörung des Noradrenolutins genau wie die des Adrenolutins mit Ascorbinsäure verhindern. Noradrenolutin zeigt bei Erregung mit UV-Licht die gleiche gelbgrüne Fluoreszenz wie Adrenolutin. Während Adrenolutin in alkalischer Lösung so schnell oxydativ zerstört wird, dass seine Fluoreszenz innerhalb von 3-4 Minuten völlig verschwindet, **dauert es 20-30 Minuten**, bis Noradrenolutin völlig oxydativ zerstört und sämtliche Noradrenolutinfluoreszenz verschwunden ist. Man kann daher leicht prüfen, ob das Eluat Noradrenolutin enthält: Wenn wiederholte Fluorimeterablesungen 5-15 Minuten nach Zugabe von Alkali eine Serie von fallenden Werten liefern, dann kann das als Beweis dafür angesehen werden, dass das Eluat Noradrenolutin enthält. Durch Zusetzen von Ascorbinsäure kann man auch die Noradrenolutinfluoreszenz über mindestens 1 Std. aufrecht erhalten, was die genaue fluorimetrische Bestimmung natürlich sehr erleichtert.

Der Unterschied in der Oxydierbarkeit von Adrenalin und Noradrenalin erlaubt die fluorimetrische Bestimmung dieser beiden Substanzen in der gleichen Blutprobe. Bei pH 3 wird innerhalb von 60 sec. alles Adrenalin, aber nur 5% des Noradrenalins oxydiert. Bei pH 6,5 wird innerhalb von 20 sec. alles Adrenalin und alles Noradrenalin oxydiert. Aus der Differenz der Fluoreszenzwerte bei pH 6,5 und pH 3 lässt sich dann der Noradrenalinegehalt errechnen. Diese Methode entspricht der kolorimetrischen Methode v. EULERS (1949) (33, 34). Die Noradrenolinfuoreszenz ist der NoradrenalinKonzentration linear. Verwendet man im Fluorimeter als erregende Wellenlänge $400 \text{ m}\mu$ (Filter A = Schott BG 12) statt $360 \text{ m}\mu$ (Filter A = Schott UB 2), dann nimmt auch hier die Fluoreszenzintensität um das drei- bis vierfache zu.

c) Genaue Methodik :

1. bis 4. wie bei der LUNDschen Methode (93) zur Adrenalinbestimmung (Seite 58) mit folgenden Änderungen:

Statt 5 ccm werden 10 ccm Plasma zur Analyse benötigt. Um die Höhe der Aluminiumoxysäule und die Filtrationszeit nicht zu erhöhen, muss man den Durchmesser der Säule mit 10 mm wählen und 2 g Al_2O_3 verwenden. Das Eluat wird auf 30 ccm verdünnt und in 3 Teile zu 10 ccm aufgeteilt, die als A, B und C bezeichnet werden.

5. und 6. A wird als Leerlösung verwendet. Da die Leerfluoreszenz die gleiche ist, sowohl wenn man die Oxydation bei pH 3 als auch wenn man die Oxydation bei pH 6,5 durchführt, kann man A als Leerlösung für B und C verwenden. A wird bei pH 6,5 für 20 Sec. mit MnO_2 oxydiert. Dann zentrifugieren und filtrieren. Zu 8 ccm des Filtrates werden 0,84 ccm 20% NaOH gegeben. 5 Minuten nach Zugabe des Alkalis werden 0,16 ccm einer 1 % Ascorbinsäurelösung der abgeblassten Leerlösung zugesetzt. B wird zur Bestimmung des Adrenalins verwendet. Mit (einer vorher durch potentiometrische Titration bestimmten Menge) 0,2 n Salzsäure wird B auf pH 3 gebracht. 60 Sec. mit MnO_2 oxydieren. Zentrifugieren und filtrieren. Zu 8 ccm des Filtrates 0,84 ccm 20% NaOH mit 0,16 ccm 1% Ascorbinsäurelösung geben.

C wird verwendet zur Bestimmung des Adrenalins und Noradrenalins. Mit (einer vorher durch potentiometrische Titration bestimmten Menge) 0,8 m Natriumphosphat wird C auf pH 6,5 gebracht. 20 Sec. mit MnO_2 oxydieren. Zentrifugieren und filtrieren. Zu 8ccm des Filtrates 0,84 ccm 20% NaOH mit 0,16 ccm 1% Ascorbinsäurelösung geben.

7. Die Fluoreszenz der Lösungen B und C kann sofort nach Zugabe der NaOH-Ascorbinsäuremischung abgelesen werden, die der Lösung A erst nach 20-30 Minuten, wenn die Fluoreszenz der Katechinamine völlig geschwunden ist.

Gleiche Mengen Noradrenolutin entwickeln nur die Hälfte der Fluoreszenz wie Adrenolutin. Aus diesem Grunde und da bei pH 3 nur 5% des Noradrenalins oxydiert werden, kann man die Fluoreszenz in B, die von Noradrenolutin verursacht wird, vernachlässigen. Dies vereinfacht die Berechnung der Ergebnisse. Die Fluoreszenzwerte werden entsprechend den Eluaten A, B und C mit a, b und c bezeichnet. $b-a$ ergibt dann die Adrenalinkonzentration, $c-b$ die Noradrenalinkonzentration. Die entsprechenden Eichkurven und Verdünnungen müssen natürlich berücksichtigt werden. Die gefundenen Werte werden mit 1,25 multipliziert um den 20% Verlust bei der Adsorption und Elution auszugleichen.

Fehlergrenze der Methode:

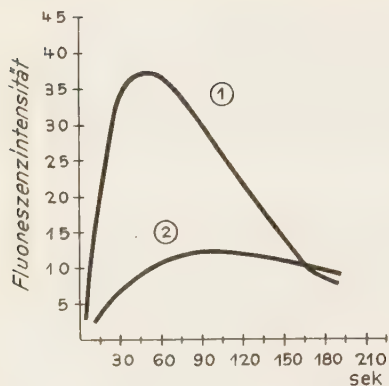
Adrenalinbestimmung $\pm 5-10\%$. Da der Noradrenalingehalt aus einem Differenzwert errechnet wird, ist die Genauigkeit der Noradrenalinbestimmung nicht ganz so hoch; die Fehlergrenze überschreitet jedoch nicht $\pm 10\%$, wenn Adrenalin- und Noradrenalinkonzentrationen etwa gleich sind. Adrenalin lässt sich bis zu 1 $\mu\%$, Noradrenalin bis zu 1-2 $\mu\%$ im Blutplasma nachweisen.

BRÜCKE et al. (98) griffen 1953 die Methode von LUND wieder auf und erzielten damit gute Ergebnisse. Statt MnO_2 verwendeten sie jedoch PbO_2 als Oxydationsmittel. Als Fluorimeter diente ihnen ein Pulfrich-Photometer: UV-Lichtquelle = Phillips Analysenlampe, Typ 75202 E/70. Filter A = Schott UG 1. Der sekundäre Strahlengang wurde durch ein Euphosfilter der Fa. Zeiss von mitgestreutem UV-Licht befreit. Sie benutzten als Vergleichsstandard einen Uranglaskeil, dessen Grünfluoreszenz

durch ein Graufilter auf die erwünschte Intensität abgeschwächt wurde. Nach ihren Angaben entwickelten äquimolare Noradrenalinmengen 37-38% der Fluoreszenzintensität äquivalenter Adrenalinkonzentrationen. Es liessen sich 0,8 μ /ccm Adrenalin und 1,6 μ /ccm Noradrenalin noch mit Sicherheit nachweisen.

HELLER/SETLOW/MYLON (1950) (99) arbeiteten ebenfalls mit der Methode von LUND. Sie verglichen die Fluoreszenzspektren von Adrenalin und Noradrenalin miteinander (Fig. 3). Das Maximum der Adrenalinfluoreszenz tritt früher auf als das der Noradrenalinfluoreszenz und liegt weit über letzterem. Überraschenderweise liefert eine Testlösung, die Adrenalin und Noradrenalin (bzw. deren fluoreszierende Oxydationsprodukte) enthält, nicht 2 Fluoreszenz-Maxima, sondern geänderte Kurven der Fluoreszenzintensität. Wie aus Fig. 4 zu ersehen ist, führt eine Zugabe von Noradrenalin zu Adrenalin zu einer beschleunigten Bildung des Adrenolutins mit einem raschen Abfall der Fluoreszenzintensität. Schon 0,2 μ Noradrenalin/ccm können diese Wirkung hervorrufen. Dabei kann man beobachten, dass die anfänglichen Gipfel der Kurven 2 und 3 die hellgrüne Farbe der Adrenalinfluoreszenz zeigen, während die zweiten Gipfel dieser Kurven die dunkelgrüne Farbe der Noradrenalin-Fluoreszenz zeigen. Die Einwirkung des Noradrenalins auf das Adrenalin könnte sich wie folgt erklären: Die Oxydationsprodukte des Noradrenalins könnten als Oxydationsmittel auf das Adrenalin einwirken und so zu einem rascheren Auf- und Abbau des Adrenolutins führen. Fig. 5 gibt eine interessante Beobachtung wieder: Setzt man dem Noradrenalin vor der Alkalibehandlung eine kleine Menge anorganischen Phosphates zu, dann erreicht das Fluoreszenzmaximum den sechsfachen normalen Wert und die Zeit, die bis zum Auftreten des Fluoreszenzmaximums vergeht, wird um die Hälfte verkürzt. Wurden Adrenalin und Phosphat kombiniert, dann wurde die Fluoreszenzintensität des Adrenalins etwas herabgesetzt und das zeitliche Auftreten des Fluoreszenzmaximums etwas verkürzt. Eine einfache Summation dieser Effekte wurde beobachtet, wenn Adrenalin, Noradrenalin und Phosphat zusammen ausgetestet wurden. Es ist nicht bekannt, auf welche Weise das Phosphat die Noradrenolutinbildung beschleunigt.

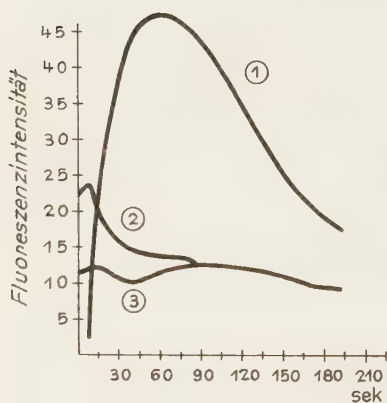
In einer weiteren Arbeit konnten HELLER/SETLOW/MYLON (1950) (100) das Fluoreszenzmaximum des Adrenalins bei 5400 $\text{\AA}$ und das des Nor-



Figur 3

- ① 2 μ g Adrenalin in 10 ccm 9 % KOH
- ② 10 μ g Noradrenalin in 10 ccm 9 % KOH

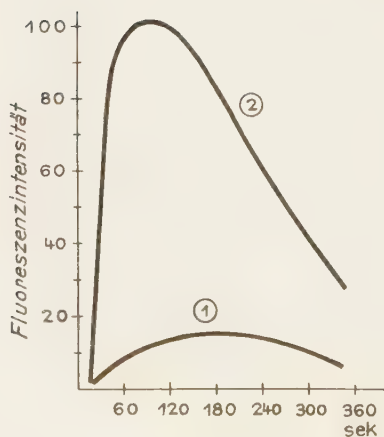
(HELLER / SETLOW / MYLON, 99)



Figur 4

- ① Summe der beiden Kurven aus Figur 3
- ② 2 μ g Adrenalin und 10 μ g Noradrenalin in 10 ccm 9 % KOH
- ③ 1 μ g Adrenalin und 10 μ g Noradrenalin in 10 ccm 9 % KOH

(HELLER / SETLOW / MYLON, 99)



Figur 5

- ① 10 μ g Noradrenalin in 10 ccm 9 % KOH
- ② 10 μ g Noradrenalin und 12 mg Na_3PO_4 in 10 ccm 9 % KOH

(HELLER / SETLOW / MYLON, 99)

adrenalins bei 5200 Å bestimmen. Dabei ist die Noradrenolutfloreszenz zehnmal schwächer als die Adrenolutfloreszenz. Die beiden Fluoreszenzspektren überlagern sich, wenn Adrenalin und Noradrenalin gemeinsam in Lösungen vorliegen, sodass dann die Bestimmung erschwert wird. Die Autoren verwendeten ein äusserst empfindliches Fluorimeter: UV-Lichtquelle = AH_4 Quecksilber-Bogenlampe. Filter A = Corning 5860 (isoliert die 365 m μ - Linie des Quecksilbers). Filter C = Wratten 74 (maximale Transmission bei 5300 Å). Photozelle = 931 - A Photomultiplier. DC - Verstärker. Galvanometer = 0 - 30 μa - meter. Die Empfindlichkeit war so hoch, dass in Lösung 0,005 $\mu\text{g}/\text{ccm}$ nachgewiesen werden konnten.

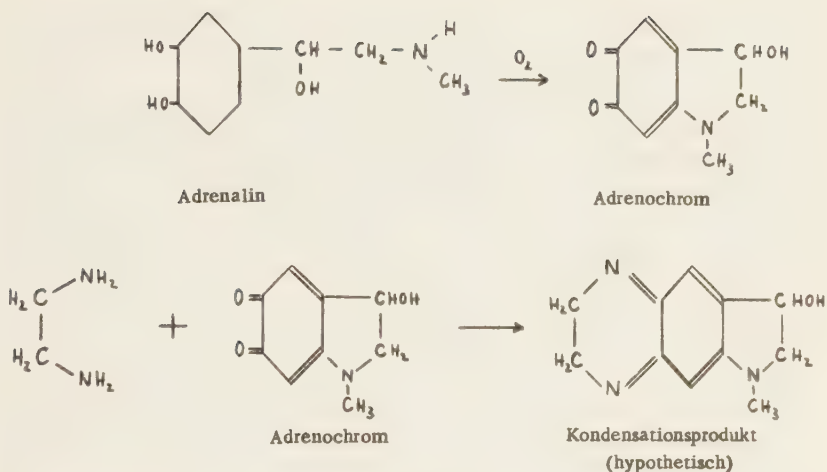
1951 mussten HELLER/SETLOW/MYLON (101) feststellen, dass Plasma die Fluoreszenz von Adrenolutin und Noradrenolutin deutlich abschwächt. Dennoch ist die Methode (100) (S. 63) empfindlich genug, um 0,2 μg Adrenalin bzw. Noradrenalin/ccm Plasma zu erfassen. 1953 wiesen MYLON/ROSTON (102) nach, dass die Abschwächung der Adrenolutin- und Noradrenolutin-Fluoreszenz durch Plasma auf die Plasmaproteine zurückzuführen ist und höchstwahrscheinlich durch die SH-Gruppen der Proteinmoleküle verursacht wird. Die Grösse der Fluoreszenz ist abhängig von der Filterung des einfallenden und des Fluoreszenzlichtes, von der Temperatur, vom Grad der Alkalinität und von der Sauerstoffkonzentration (100). Mit steigender Temperatur nimmt die Fluoreszenz ab. Änderung des pH von 12,65 auf 12,95 verdoppelt die Grösse der Fluoreszenz, ohne dass sich das zeitliche Auftreten des Fluoreszenzmaximums ändert (100). Es ist klar, dass beim Fehlen von Sauerstoff keine Fluoreszenz entwickelt wird. Ist nicht genügend Sauerstoff vorhanden, dann äussert sich das in einer Abschwächung des Fluoreszenzmaximums und einer fehlenden Zerstörung der Fluoreszenz. Die Menge Sauerstoff, die in einigen ccm Aqua dest., das mit Luft in Verbindung steht, enthalten ist, ist mehr als 100 μg Adrenalin äquivalent und also im Überschuss vorhanden, wenn es kleine Adrenalinmengen zu bestimmen gilt (100).

5. Methode nach WEIL-MALHERBE/BONE.

a) Bestimmung der Summe von Adrenalin und Noradrenalin.

NATELSON/LUGOVOY/PINCUS (1949) (71) gelang es, das Adrenalin in eine Substanz zu überführen, die fluoresciert, wenn man sie mit 435 m μ erregt. Dabei ist die fluorescierende Substanz nicht Adrenolutin. Dies wurde auf folgende Weise erreicht: Das Adrenalin wird in alkalischer Lösung mit einem primären organischen Amin wie z.B. Äthylendiamin behandelt. Dabei entsteht ein fluorescierendes Kondensationsprodukt, das sich mit aliphatischen Alkoholen wie z.B. Butylalkohol extrahieren lässt. Diese Fluoreszenz ist über mehrere Tage konstant. Als Filter C diente ein Filter mit einer maximalen Transmission bei 500 m μ , als Fluorimeter ein Farrand-Fluorimeter. Vom erhaltenen Fluoreszenzwert wurde der entsprechende Leerwert abgezogen, der durch Lichtstreuung in der Lösung verursacht wird. Die Fluoreszenz dieses Adrenalinproduktes ähnelt der des Riboflavins. Eine Unterscheidung ist jedoch möglich, da Adrenalin von Oxydationsmitteln (z.B. KMnO_4) zerstört wird, Riboflavin jedoch nicht.

Von den Untersuchungen von NATELSON/LUGOVOY/PINCUS angeregt, beschäftigten sich WEIL-MALHERBE/BONE (1952) (103) eingehend mit dieser Reaktion des Adrenalins und entwickelten eine Methode, die die Summe von Adrenalin und Noradrenalin im Plasma bestimmen lässt. Versetzt man eine alkalische Adrenalinlösung in Gegenwart von Sauerstoff mit Äthylendiamin, dann entsteht ein fluorescierendes Kondensationsprodukt. Die Reaktion bleibt aus, wenn kein Sauerstoff vorhanden ist. Ersetzt man das Adrenalin durch Adrenochrom, dann liefert dieses sowohl in Gegenwart, wie in Abwesenheit von Sauerstoff die gleiche Fluoreszenzkurve wie Adrenalin mit Sauerstoff. Man kann daher annehmen, dass der Kondensation eine Oxydation des Adrenalins zu Adrenochrom vorausgeht und dieses dann mit Äthylendiamin das fluorescierende Kondensationsprodukt bildet. Die Reaktion lässt sich wie folgt formulieren:



Die Konstitutionsformel des Kondensationsproduktes muss noch als hypothetisch angesehen werden.

Vorteile der Methode: Die Fluoreszenz des Endextraktes ist über mindestens 24 Stunden konstant, da das instabile, leicht reagierende Adrenochrom in statu nascendi in das vollständig stabile Kondensationsprodukt quantitativ überführt wird. Mit der Methode kann man 1 μ /1 Plasma mit Sicherheit nachweisen. Das Wiederfinden des Adrenalin im Kondensationsprodukt ist quantitativ und daher braucht man keinen Korrektionsfaktor. Schliesslich erhält man genau addierte Ergebnisse, wenn Adrenalin und Noradrenalin nebeneinander in Lösung vorliegen, während die Entstehung und Abnahme der Adrenolutinfluoreszenz durch Noradrenalin beschleunigt wird (HELLER/SETLOW/MYLON, 99).

Methodik:

Die Kondensation wird ausgeführt, indem man die Adrenalinlösung für 20 Min. zusammen mit einer Mischung von Äthylendiamin und einer wässrigen Lösung von Äthylendiamindihydrochlorid auf 50° C erhitzt. Äthylendiamin wird hinzugefügt, um das erforderliche alkalische pH der Mischung, nämlich pH 10,4 zu erreichen. Äthylendiamindihydrochlorid liefert das ionisierte Äthylendiamin, das zur Ausführung der Kondensation wesentlich notwendig ist. Es ist zweifellos der reagierende

Stoff. Zur Extraktion des fluoreszierenden Kondensationsproduktes wird iso-Butanol verwendet. Eine quantitative Extraktion wurde erreicht, indem die wässrige Phase mit NaCl abgesättigt wurde.

Die initiale Trennung des Adrenalins aus den zu untersuchenden Lösungen durch Adsorption an Aluminium wurde von LUND mit einigen Abänderungen übernommen, die die Autoxydation des Adrenalins vor und während der Adsorption verhindern sollen. Säuregewaschenes Aluminium wird verwendet, in Menge jedoch reduziert. Ein anderer wichtiger Punkt ist die Entfernung von Schwermetallspuren aus der Natriumacetatlösung, die dem Plasma vor der Adsorption zugesetzt wird. Man erreicht dies durch Kationenaustauscher. Schliesslich wird das verdünnte Plasma genau auf pH 8,4 gebracht. Das Blut wird direkt in eine Lösung von Fluorid und Thiosulfat abgenommen, die antoxydative und antikoagulative Eigenschaften miteinander vereinigt. Der Adrenaliningehalt des Blutes bleibt über 24 Stunden konstant, wenn man die Blutprobe im Kühlschrank aufbewahrt.

a) Reagentien:

1. Natriumfluorid - Natriumthiosulfat - Lösung:
2 g NaF und 3 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ werden in Aqua dest. zu 100 ccm aufgelöst. Die Lösung wird in sterilen Ampullen zu 6 ccm aufbewahrt.
2. 0,5 n Natriumcarbonat-Lösung.
3. Natriumacetatpuffer pH 8,4: Eine 0,5 m Natriumacetatlösung wird durch Zugabe von 0,5 m Na_2CO_3 -Lösung auf pH 8,4 gebracht.
4. "Säure-gewaschenes" Aluminium: 100 g Al_2O_3 (British Drug Houses Ltd.) werden 20 Min. lang in 500 ccm kochender 2 n HCl umgerührt, gefiltert und dann mit weiteren 500 ccm heisser 2n HCl gewaschen, indem diese über den im Filter bleibenden Rückstand gegossen wird. Der Filterrückstand wird mehrmals mit Aqua dest. nachgewaschen. Schliesslich wird das Al_2O_3 bei 300°C über 3 Stunden getrocknet.
5. 0,2 n Essigsäure.
6. 2 m Äthylendiamidihydrochlorid-Lösung. Reines Äthylendiamin wird in der benötigten Menge 6 n HCl aufgelöst.
7. Äthylendiamin oder Äthylendiaminhydrat, wiederholt destilliert.
8. Iso-Butanol: Der im Labor verwendete Reinheitsgrad ist ausreichend.

b) Aufbereitung des Blutes:

5 ccm Fluorid-Thiosulfatlösung werden in einer Spritze aufgezogen, mit der dann etwa 15 ccm Blut der Vena cubitalis entnommen werden. Die Spritze wird in einem 25 ccm Zylinder entleert und das Volumen wird notiert (v_1 in ccm). Das Plasma (v_2 in ccm) wird durch Zentrifugieren abgetrennt und ein gleiches Volumen Natriumacetatpuffer hinzugegeben. Die Mischung wird durch Hinzufügen von 3-5 Tropfen 0,5 n Natriumcarbonatlösung auf pH 8,4 gebracht (genau mit einem Potentiometer kontrollieren). Als Aluminiumsäule dient ein 18 cm langes Glasrohr (innerer Durchmesser 5 mm), dem eine 50 cm "Zwiebel" aufgesetzt ist. Am Ende des Glasrohres befindet sich eine Einengung, an der ein Glaswollbausch angebracht ist. Die Säule wird auf eine Filterflasche aufmontiert, die an einem Saugapparat angeschlossen ist. Durch Einbringen von 0,7 g säuregewaschenem, trockenem Aluminium, gefolgt von 5 ccm Acetatpuffer wird die Aluminiumsäule hergerichtet. Mit einem ausgezogenen Glasstab wird das Aluminium umgerührt, bis alle Luftblasen verschwunden sind. Nachdem das Aluminium sich zu Boden gesetzt hat, wird der Saugapparat angeschaltet, so reguliert, dass etwa 20-30 Tropfen pro Minute abgehen. Als nächstes wird die Plasma-Acetatsmischung durch die Aluminiumsäule gefiltert, der 5 ccm Acetatpuffer und 5 ccm Aqua dest. folgen. Die Filtrate werden verworfen. Das adsorbierte Aluminium wird ausgewaschen, indem 5 ccm 0,2 n Essigsäure, gefolgt von 5 ccm Aqua dest. durch die Aluminiumsäule geschickt werden.

Nach Zugabe von 5 ccm Äthylendiamindihydrochlorid-Lösung und 0,7 ccm Äthylendiamin (oder 1 ccm Äthylendiaminhydrat) wird das Eluat auf 50° C erhitzt für 20 Minuten, dann auf Zimmertemperatur abgekühlt und mit NaCl (etwa 4 g) gesättigt. Die Lösung wird mit 6 ccm iso-Butanol in einem mechanischen Schüttler extrahiert und danach leicht zentrifugiert, um die Emulsion aufzuheben. Schliesslich wird die Adrenalinfluoreszenz des iso-Butanol-Extraktes bestimmt. Zusammen mit dem Plasma-Eluat werden eine Adrenalinstandard-Lösung (0,2 µ in 10 ccm) und eine Leerlösung der Kondensation und Extraktion unterworfen.

c) Fluorimeter:

UV-Lichtquelle = 125 Watt Quecksilberdampf Lampe (Typ MBL/D, British Thomson-Houston Co., Ltd.). Filter A = Chance OB 10. Filter C

= Chance OY 4. Unicam S.P. 500 Spektrophotometer. Die Fluoreszenzwerte werden 45 Minuten nach Einschalten der Quecksilberdampfampe abgelesen, um Schwankungen der Intensität der erregenden Wellenlänge (435 m μ) auszuschalten. Von den Fluoreszenzwerten werden die entsprechenden Leerfluoreszenzen abgezogen. Der Fluoreszenzvergleich erfolgt gegen Adrenalinstandardlösungen. Es werden jeweils 2 Messungen durchgeführt, um einen guten Mittelwert zu erhalten. Wenn die fluorimetrische Bestimmung die Gegenwart von γ -Adrenalin anzeigt, dann sind in 1 l Plasma

$$\frac{a \cdot v_1 \cdot 1000}{v_2 (v_1 - 5)} \quad \gamma \text{ Adrenalin enthalten.}$$

Spezifität der Methode:

Fluoreszenz von verschiedener Intensität geben alle Katechinderivate mit Ausnahme von Dopa (Tab.4). Dopa bildet wahrscheinlich ein Derivat, das durch iso-Butanol aus der alkalischen Lösung nicht oder nur zu einem ganz geringen Teil extrahiert wird. Keine der untersuchten Nicht-Katechinsubstanzen gab eine nennenswerte Fluoreszenz, nachdem ihre Lösungen dem chromatographischen Adsorptionsprozess unterworfen worden waren. Die Methode ist weniger spezifisch als die, bei denen Adrenolutin gebildet wird. Dies ist jedoch ohne praktische Folge, da physiologische

Katechinderivate, die keinen Indolring bilden können - wie z.B. Dopa - bei der Extraktion mit iso-Butanol kaum erfasst werden. Die entstehende Fluoreszenz ist einzig und allein auf die Katechinamine zurückzuführen und in keiner Weise von irgendwelchen Plasmakomponenten verursacht. Die Spezifität der Methode kann auch aus Tab.4 ersehen werden.

Die Fluoreszenzintensität des Noradrenalins ist 1/5 der einer äquimolaren Adrenalinmenge. Die Fluoreszenz einer Mischung der beiden Substanzen ist gleich der Summe der Fluoreszenzwerte der beiden getrennten Substanzen. Wie schon mitgeteilt, konnte bei der Äthylendiaminmethode keine gegenseitige Interferenz beobachtet werden, wie sie HELLER/SETLOW/MYLON (1950) (99) bei der Adrenolutinfluoreszenz berichten. So lange sich bei dieser Methode die Noradrenalinwerte nicht von den Adrenalinwerten abtrennen lassen, muss der Katechinamingehalt in γ -Adrenalin / 1 Plasma angegeben werden. Der Adrenalingehalt des normalen venösen Blutes wurde zu $\sim 3 \mu$ / 1 bestimmt.

TABELLE 4

Spezifität der Methode (WEIL-MALHERBE / BONE, 103)

<u>Katechinderivate</u>	<u>Formel</u>	<u>rel. Fluoreszenz</u>
1-Adrenalin	(3)HO (4)HO $C_6H_3 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot NHCH_3$ (1)	100
Adrenochrom	$C_9H_9NO_3$	100
1-Noradrenalin	(3)HO (4)HO $C_6H_3 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot NH_2$ (1)	20
Epinin	(3)HO (4)HO $C_6H_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot NHCH_3$	48
Isoprenalin	(3)HO (4)HO $C_6H_3 \cdot CHOH \cdot CH_2 \cdot NHCH \begin{smallmatrix} CH_3 \\ CH_3 \end{smallmatrix}$	56
Brenzkatechin	(1)HO (2)HO C_6H_4	96
1-Dopa	(3)HO (4)HO $C_6H_3 \cdot CH_2 \cdot CHNH_2 \cdot COOH$	0, 2

Andere Verbindungen:

Ephedrin	$C_6H_5 \cdot CHOH \cdot CH \begin{smallmatrix} NH_2 \\ CH_3 \end{smallmatrix}$	$2 \cdot 10^{-4}$
Amphetamin	$C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH \begin{smallmatrix} NH_2 \\ CH_3 \end{smallmatrix}$	$1 \cdot 10^{-6}$
Tyramin	(p) $HO \cdot C_6H_4 \cdot CH_2 \cdot NH_2$	$3 \cdot 10^{-3}$
Resorcin	(1)HO (3)HO C_6H_4	~ 0
Hydrochinon	(1)HO (4)HO C_6H_4	~ 0
Nikotinamid	$C_5H_4 \cdot CONH_2$	~ 0

b) Bestimmung von Adrenalin neben Noradrenalin.

1953 gelang es WEIL-MALHERBE/BONE (104) ihre Methode so auszudehnen, dass man Adrenalin und Noradrenalin nebeneinander im Plasma bestimmen kann. Wie schon früher bemerkt, unterscheiden sich die Kondensationsprodukte von Adrenalin und Noradrenalin: das von Adrenalin liefert eine gelbe bis orange Fluoreszenz, das von Noradrenalin eine grüne. Dieser Unterschied wurde zur getrennten Bestimmung ausgenutzt.

Methodik:

Fluorimeter: Schon beschrieben (Seite 69). Statt Reagensröhrchen wurden rechteckige Silikat-Kuvetten verwendet (innere Masse 23·23·10 mm). Filter A = Chance OB 10 isoliert die 435 m μ Quecksilberlinie. Der Gipfel der Fluoreszenz des Adrenalinkondensationsproduktes liegt bei 580 m μ , der des Noradrenalinkondensationsproduktes bei 450 m μ . Misst man mit einem Blau-grün-Filter als Filter C (= Ilford Bright Spektrum Filter 623), dann ist die Fluoreszenz-Intensität von Adrenalin und Noradrenalin fast gleich. Misst man jedoch mit einem Gelb-Filter (Chance OY 4) als Filter C, dann ist die Fluoreszenz-Intensität des Adrenalins 4 1/2 mal so hoch wie die des Noradrenalins. Bessere Filter-Kombinationen könnten möglich sein; dies muss erst noch ausprobiert werden. Die Berechnung erfolgt nach folgenden Gleichungen:

$$A + \frac{N}{m} = y \quad (1)$$

$$A + \frac{N}{n} = b \quad (2)$$

$$N = \frac{mn(b-y)}{m-n} \quad (3)$$

$$A = \frac{y-N}{m} = \frac{b-N}{n} \quad (4)$$

m = Verhältnis von Adrenalin-: Noradrenalin-Fluoreszenz mit dem Gelb-
filter

n = Verhältnis von Adrenalin-: Noradrenalin-Fluoreszenz mit dem
Blau-grün-Filter

A = Adrenalinmenge der Mischung

N = Noradrenalinmenge der Mischung

y = Adrenalinmenge, die der mit dem Gelbfilter gemessenen Fluoreszenz entspricht.

b = Adrenalinmenge, die der mit dem Blaugrünfilter gemessenen
Fluoreszenz entspricht.

Zuerst wird die Fluoreszenz mit dem Gelbfilter und dann mit dem Blaugrün-Filter gemessen. Vergleich und Eichung mit Adrenalin- bzw. Noradrenalinstandard-Lösungen. Die Werte für m und n wurden bestimmt:

$$\begin{array}{lcl} m = 4,44 \pm 0,045 & \frac{m \cdot n}{m-n} & = 1,257 \pm 0,006. \\ n = 0,98 \pm 0,003 & & \end{array}$$

Als Durchschnittswerte für normales venöses menschliches Blut werden von WEIL-MALHERBE/BONE (105) genannt:

$$\begin{array}{lcl} 2-3 \text{ } \mu\text{g Adrenalin} & / & 1 \text{ Plasma} \\ 4-5 \text{ } \mu\text{g Noradrenalin} & / & 1 \text{ Plasma} \end{array}$$

Um diese Ergebnisse zu überprüfen, führten WEIL-MALHERBE/BONE noch folgenden Versuch durch: Aus dem Plasma von 150 ccm Blut wurden die Katechinamine mit n-Butanol, aus diesem anschließend mit 0,05 n-HCl extrahiert und durch eine Aluminiumsäule geschickt. Nach Elution mit verdünnter Essigsäure wurden die Eluate im Vakuum eingedampft. Die konzentrierten Eluate wurden nach GOLDENBERG/FABER/ALSTON/CHARGAFF (S.35) papierchromatographisch getrennt. Die den Katechinaminen entsprechenden Stellen der Chromatogramme wurden ausgeschnitten, mit verdünnter HCl eluiert und die erhaltenen Extrakte fluorimetrisch bestimmt. Dabei fanden sich als Durchschnittswerte für normales venöses menschliches Blut:

$$\begin{array}{lcl} 2,2 \pm 0,06 \text{ } \mu\text{g Adrenalin} & / & 1 \text{ Plasma} \\ 6,8 \pm 0,30 \text{ } \mu\text{g Noradrenalin} & / & 1 \text{ Plasma.} \end{array}$$

Diese Übereinstimmung der fluorimetrisch und papierchromatographisch bestimmten Werte ist zufriedenstellend. Die fluorimetrische Methode lässt 0,001 $\mu\text{g/ccm}$ Adrenalin bzw. Noradrenalin erfassen. Die Fehlergrenze beträgt $\pm 12\%$. Die errechneten Werte weichen im Durchschnitt von den tatsächlichen um etwa 6% ab.

Dass wirklich Adrenalin und Noradrenalin nachgewiesen wurden, ergibt sich aus Folgendem: Die fluoreszierenden Substanzen werden wie die Katechinamine durch Aminoxydase quantitativ zerstört. Sie haben die gleiche R_F -Werte und die gleichen spektralen Eigenschaften wie die Katechinamine.

6. Methode nach MANGER/BALDES/FLOCK/BOLLMAN/BERKSON/JACOBS.

1953 teilten MANGER/BALDES/FLOCK/BOLLMAN/BERKSON/JACOBS (106) eine Modifikation der Methode nach WEIL-MALHERBE/BONE (104) mit. Die wesentliche Änderung bestand im Gebrauch von Natriumthiosulfat, das die Fluoreszenz von Adrenalin und Noradrenalin verschieden beeinflusst. Gibt man vor der Kondensation mit Äthylendiamin zu einer sauren Adrenalinlösung Natriumthiosulfat, dann wird die Fluoreszenz des Adrenalin-Kondensationsproduktes nicht beeinträchtigt, während die Fluoreszenz des Noradrenalin-Kondensationsproduktes unter gleichen Bedingungen um 22% des ursprünglichen Wertes abgeschwächt wird. Diese verschiedene Wirkung des Natriumthiosulfats auf die Kondensationsprodukte von Adrenalin und Noradrenalin bildet die Grundlage der Methode, die Adrenalin und Noradrenalin nebeneinander bestimmen lässt. Die Versuche wurden mit künstlichen Adrenalin- und Noradrenalin-Lösungen durchgeführt. Eine Ausdehnung der Methode auf die Bestimmung der Katechinamine im Blut, Urin und Gewebsextrakten ist beabsichtigt. Als geringste nachweisbare Menge werden 0,005 μ -Adrenalin bzw. Noradrenalin / ccm erfasst.

Methodik:

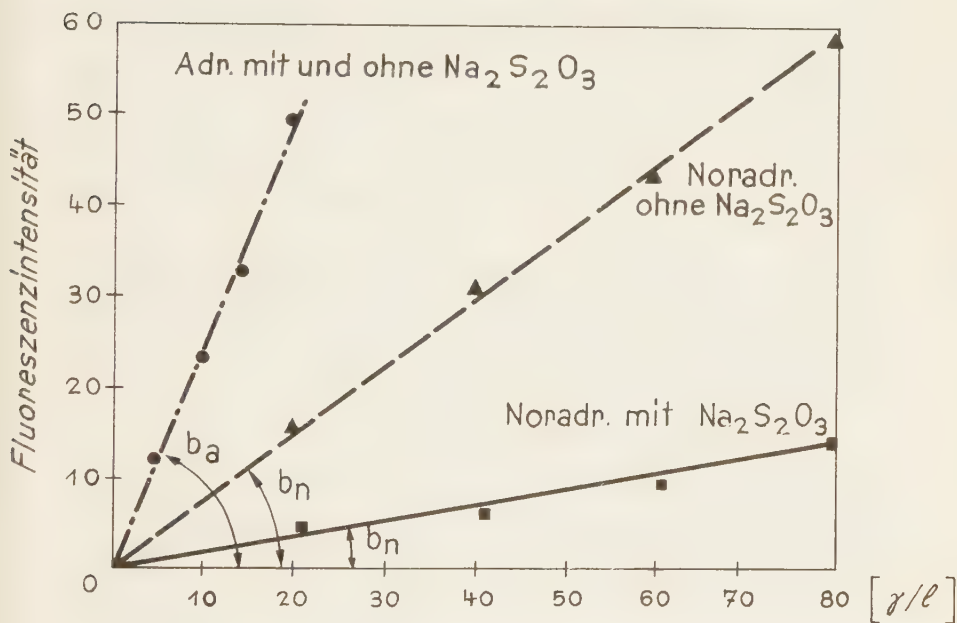
Adrenalin-(5-20 μ /l) und Noradrenalin-(20-80 μ /l) Standardlösungen werden hergestellt. Jeweils 10 ccm der Standardlösungen werden ohne Zugabe von Natriumthiosulfat mit Äthylendiamin kondensiert. Das fluoreszierende Kondensationsprodukt wird mit iso-Butanol extrahiert und seine Fluoreszenz gemessen. Dann werden jeweils 10 ccm der Standardlösungen auf pH 3 gebracht und 1 ccm 0,9 m $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ vor der Kondensation mit Äthylendiamin zugegeben; anschliessend wird sofort die Fluoreszenz gemessen.

Fluorimeter: Pfaltz/Bauer-Photofluorimeter. UV-Lichtquelle = AH_4 Quecksilberdampflampe. Filter A = eine Kombination von Corning-Filter 3389 und 5113, die die Corning-Farbspezifität 5-74 liefert. Als Filter C diente eine Kombination von Corning-Filter 3480 und 4304, die die Corning-Farbspezifität 3-110 liefert. Photomultiplier RCA $_{1\text{Pz}_1}$. Rubicongalvanometer. Eichung und Standardisierung des Gerätes mit fluoreszierendem Glas.

Ergebnisse:

Die Fluoreszenzintensität war der Adrenalin- und Noradrenalin-Konzentration mit und ohne Natriumthiosulfat linear. Im Falle des Adrenalins hatte

die Zugabe von Natriumthiosulfat keinen Einfluss auf die Fluoreszenz, während die Fluoreszenz des Noradrenalins durch Zugabe von Natriumthiosulfat um 22% gegenüber dem ursprünglichen Wert (ohne Natriumthiosulfat) abgeschwächt wurde. Fig. 6 zeigt diese Ergebnisse.



Figur 6: Fluorimeterzeigerwerte in Beziehung zu Adrenalin- und Noradrenalinconzentrationen mit und ohne $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Die Geraden wurden aus der Gleichung $R = bC$ errechnet, wo R der Zeigerwert und C die Konzentration ist. Die entsprechenden b sind Konstante und im Text angegeben, so dass sich C errechnen lässt (MANGER et al., 106).

Unter den genannten Versuchsbedingungen ergeben sich als Konstante:

- a) Adrenalin mit oder ohne Thiosulfat $b_a = 2,24$
 b) Noradrenalin ohne Natriumthiosulfat $b_n = 0,708$
 c) Noradrenalin mit Natriumthiosulfat $b_n = 0,153$

Für Mischungen der beiden Amine gelten folgende Gleichungen, wenn keine gegenseitigen synergistischen oder hemmenden Effekte auf die Fluoreszenz vorliegen:

$$(1) \quad R_1 = b_a C_a + b_n C_n = 2,24 C_a + 0,708 C_n$$

$$(2) \quad R_2 = b_a C_a + b'_n C_n = 2,24 C_a + 0,153 C_n$$

Dabei ist R_1 der Zeigerwert ohne Natriumthiosulfat, R_2 der mit Natriumthiosulfat, C_a die Konzentration des Adrenalins in g/l und C_n die Konzentration des Noradrenalins in g/l. Die Katechinamin-Konzentrationen ergeben sich dann aus den Gleichungen (3) und (4):

$$(3) \quad C_n = 1,802 (R_1 - R_2)$$

$$(4) \quad C_a = 0,5695 R_2 - 0,1321 R_1$$

Die nach diesen Gleichungen errechneten Adrenalin- und Noradrenalinwerte stimmten gut mit den tatsächlichen überein.

7. Methode nach v.EULER/FLODING.

v.EULER/FLODING (107) bezeichneten 1955 die Methode von WEIL-MAL-HERBE/BONE als zu unspezifisch. Sie griffen daher auf die Adrenolutin-Fluoreszenz zurück und teilten folgende Methode zur Bestimmung der Katechinamine in Lösung mit: Die Methode basiert auf der verschiedenen Oxydation von Adrenalin und Noradrenalin durch $K_3Fe(CN)_6$. Bei pH 3,5 wird innerhalb von 3 Minuten -in Gegenwart von Zinksulfat, das die Oxydation des Adrenalins beschleunigt- alles Adrenalin, aber nur 2-4% des Noradrenalins zu Adrenochrom bzw. Noradrenochrom oxydiert. Bei pH 6 wird innerhalb von 2 Minuten alles Adrenalin und Noradrenalin oxydiert.

Adrenochrom und Noradrenochrom werden -von Ascorbinsäure geschützt- in Adrenolutin und Noradrenolutin quantitativ überführt. Die Adrenolutin- bzw. Noradrenolutin-Fluoreszenz sind für mindestens 1 Stunde stabil.

Methodik:

Reagentien:

1 m Essigsäure-Acetatpuffer-Lösung pH 3,5

1 m Essigsäure-Acetatpuffer-Lösung pH 6,0

0,25 % $K_3Fe(CN)_6$ Lösung

0,5 % $ZnSO_4$ Lösung

20 % NaOH Lösung

2 % Ascorbinsäure-Lösung

"Kombiniertes Reagenz":

9 ccm der 20% NaOH Lösung werden unmittelbar vor Gebrauch mit 1 ccm der 2% Ascorbinsäure-Lösung gemischt.

Eine entsprechende Menge der zu untersuchenden Probe wird in einen (mit einem Glasstöpsel verschlossenen) 10 ccm Zylinder gegeben. Dazu kommen 1 ccm 1 m Acetatpuffer-Lösung pH 6 und 0,1 ccm 0,25% $K_3Fe(CN)_6$ Lösung. Nach 2 Minuten wird 1 ccm des kombinierten Reagenz zugesetzt und bis zur 10 ccm Marke mit Aqua dest. aufgefüllt. Mischen, in die Kuvetten übertragen und die Fluoreszenz nach 5-60 Minuten ablesen. In gleicher Weise führt man eine Bestimmung bei pH 3,5 (3 Minuten) durch. Die Leerfluoreszenz wird mit einer Leerlösung ermittelt: Die Probe wird mit 1 ccm 1 m Acetatpuffer-Lösung pH 6 versetzt, dann werden 0,1 ccm 0,25% $K_3Fe(CN)_6$ Lösung und schliesslich 0,9 ccm 20% NaOH Lösung zugegeben. 2 Minuten stehen lassen. Nach dieser Zeit ist die spezifische Fluoreszenz infolge oxydativen Abbaues des Adrenolutins und Noradrenolutins verschwunden. In Gegenwart von $K_3Fe(CN)_6$ schwindet die Fluoreszenz von Noradrenolutin weit schneller als mit der LUNDschen Methode (93), die dafür 20-25 Minuten erfordert. Die Fluoreszenz der Leerlösung wurde mit und ohne Zinksulfat, sowohl bei pH 3,5 als auch bei pH 6 bestimmt. Die Schwankungen waren so gering, dass man diese vernachlässigen und für alle Bestimmungen den gleichen Leerfluoreszenzwert verwenden kann.

Fluorimeter: Nach WEIL-MALHERBE/BONE (103, 104) in Verbindung mit einem Beckmann DU- Spektrophotometer. Rechteckige Silikatkuvetten (Durchmesser 23.35.10 mm). Filter A = Schott BG 12. Filter C = Chance OY 4. Das Gerät wurde mit einer Chininsulfat-Lösung (0,1 n H₂SO₄) geeicht.

Berechnung der Adrenalin- und Noradrenalinwerte: Enthält die Mischung weniger als 50% Noradrenalin, dann kann man den Adrenalinwert der Bestimmung bei pH 3,5 entnehmen und die 2-4% mitoxidierten Noradrenalins vernachlässigen. Der Noradrenalinwert ergibt sich als Differenz aus den Bestimmungen bei pH 6 und pH 3,5. Enthält die Probe mehr als 50% Noradrenalin, dann berechnet man genauer nach folgenden Gleichungen:

$$\text{Noradrenalin} = y = \frac{a (A-B) m}{100 - n}$$

$$\text{Adrenalin} = x = \frac{a (B-F)}{100} - \frac{ny}{100 m}$$

A = Fluoreszenzwert bei pH 6,0

B = Fluoreszenzwert bei pH 3,5

F = Fluoreszenzwert der Leerlösung

a = ~~g~~ Standard, die in 10 ccm Standardlösung enthalten sind

m = Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten Adrenalin: Noradrenalin

n = % Noradrenalin, die bei pH 3,5 in 3 Min. oxydiert werden.

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen war für gleiche Konzentrationen Adrenalin- bzw. Noradrenalinhydrochlorid m = 1,6 und n = 4 %.

Spezifität der Adrenolutin- bzw. Noradrenolutin-Fluoreszenz.

Wie schon früher erwähnt, sind die Methoden, die mit der Äthylendiamin-Kondensation arbeiten, weniger spezifisch als die Methoden, die sich der Adreno- bzw. Noradrenolutin-Fluoreszenz bedienen. Viele Autoren haben die Spezifität der Adreno- bzw. Noradrenolutin-Fluoreszenz untersucht. In Tabelle 5 werden erst die Substanzen mitgeteilt, die bei Gegenwart von Sauerstoff nach Zugabe von Alkali keine Fluoreszenzreaktion geben.

Aceton	Cystin	Milchsäure ⁺
Acetylcholin ⁺	Ephedrin ⁺⁺	Natriumcitrat ⁺
Adrenalon ^o	Ergotin	Neosynephrin ^o
Alanin	Fettsäuren	Norephrin ^o
Aneurin	Glukose	Phosphorsäure
Arginin	Glutathion	Rhodanide
Ascorbinsäure ⁺	Glykogen	Salzsäure
Äthylalkohol	Glykokoll ⁺	Salze von Metallen
Brenzkatechin ^o	Heparin ⁺	und Metalloiden
Buttersäure	Histamin ⁺	Synephrin ^o
Cortin (DOCA) ⁺	Hypophysin ⁺	Thyrim
Creatin	Insulin	Tryptophan
Creatinin ⁺	Kallekrein ⁺	Tyrosin
Cystein	Liquoid (Roche)	Weinsäure

Tabelle 5: Substanzen, die bei Gegenwart von Sauerstoff nach Zugabe von Alkali keine Fluoreszenzreaktion geben.

ohne Zeichen	= von LEHMANN/MICHAELIS	untersuchte Substanzen
mit +	= von JØRGENSEN	untersuchte Substanzen
mit o	= von LUND	untersuchte Substanzen
mit ++	= von KONZETT/WEISS	untersuchte Substanzen

Sympatol (KONZETT/WEISS, 78) und Epinin (JØRGENSEN, 81) geben die Fluoreszenzreaktion nur in viel höheren Konzentrationen. Propynalin (LUND, 93) entwickelt 70% der Adrenolutinfluoreszenz. ANNERSTEN (108) fand, dass -wie auch LEHMANN/MICHAELIS (85) berichten- Gallensalze, Eisensalze und Kupfersalze in einem bestimmten Ausmass

die Intensität der Fluoreszenz abschwächen.

Die Angaben über die Noradrenolutinfluoreszenz differieren: Noradrenolutin entwickelt nach LUND (93) und WEST (90) erst in weit höherer Konzentration die gleiche Fluoreszenz wie Adrenalin. Genauerer Angaben machen diese beiden Autoren nicht. HELLER/SETLOW/MYLON (100) bezeichnen die Noradrenolutinfluoreszenz als 10 mal schwächer als die Adrenolutinfluoreszenz. In den Versuchen von BRÜCKE/KAINDL/KOBINGER/KRAUPP/MAYER (98) gaben äquimolare Noradrenalinmengen 37-38% der Fluoreszenzintensität äquivalenter Adrenalinkonzentrationen. Warum sich die Angaben von BRÜCKE et al. von denen der übrigen Autoren unterscheiden, ist nicht bekannt.

Abschliessend lässt sich mit v.EULER/FLODING (107) sagen:

"Wie schon BU-LOCK/HARLEY-MAŞON (109) es theoretisch gefordert haben und wie LUND (93, 97) es unabhängig von diesen nachweisen konnte, sind nur die Katechinamine in der Lage, ein Fluoreszenzprodukt aus den entsprechenden -chromen zu bilden, die eine OH-Gruppe am β -C-Atom (nächst dem Ring) und ein H-Atom am α -C-Atom der Seitenkette tragen. Man darf ruhig annehmen, dass in biologischem Material neben Adrenalin und Noradrenalin keine nennenswerten Mengen anderer Katechinamine mit einer OH-Gruppe in der Seitenkette vorkommen. Daher darf diese Reaktion als sehr spezifisch angesprochen werden".

Zusammenfassender Überblick

Adrenalin entwickelt bei Zusatz von Alkali im UV-Licht eine apfelgrüne Fluoreszenz (S.45). In Lösung lassen sich noch sehr geringe Adrenalinkonzentrationen nachweisen. Schwieriger war es, Methoden für die Erfassung des Adrenalin-Blutspiegels auszuarbeiten. GADDUM/SCHILD, TIEG und KONZETT/WEISS (S.45) konnten den Adrenaliningehalt des Blutes nicht bestimmen, da störende - wohl von den Plasmaproteinen verursachte - Nebenfluoreszenzen auftraten. Es galt daher, diese Nebenfluoreszenzen auszuschalten.

Säurefällung der Plasmaproteine (GADDUM/SCHILD; S.45) erwies sich als ungünstig, da der grösste Teil des Adrenalins mitgerissen wurde.

Dialyse des Blutes gegen Aqua dest. (v.HUEBER; S.46) oder gegen HCl-Glykokoll-Puffer erlaubte nach JØRGENSEN (S.46) den Nachweis von Adrenalin im Dialysat. BLOCH (S.46) und v.PORAT (S.47) verneinen jedoch die Möglichkeit der Adrenalinbestimmung im Blut mit dieser Methode.

LEHMANN/MICHAELIS (S.47) isolierten die Adrenalinfluoreszenz mit optischen Filtern. Da die Filter nicht die gesamten Nebenfluoreszenzen wegschnitten, zerstörten LEHMANN/MICHAELIS die Adrenalinfluoreszenz durch Formaldehydzugabe und konnten so die Adrenalinfluoreszenz von den unspezifischen Nebenfluoreszenzen abtrennen. STAUB/KLINGLER und v.PORAT (S.49) gelang es jedoch nicht, mit dieser Methode Adrenalin im Plasma nachzuweisen.

Die Kritik an den Methoden von JØRGENSEN und LEHMANN/MICHAELIS veranlassten ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW (S.49), diese Methoden zu verbessern. Ihre Methode unterscheidet sich von der nach LEHMANN/MICHAELIS im Prinzip nur durch die Wahl eines besseren Fluorimeters. War bisher die Fluoreszenz im Vergleich mit einer Eosinlösung (JØRGENSEN) bzw. mit einem Glasstandard (LEHMANN/MICHAELIS) gemessen worden, so wurde nun die Fluoreszenz mit einer Photozelle über einen Verstärker an einem Galvanometer angezeigt. Mit diesem Fluorimeter (S.50) liessen sich die bestehenden subjektiven und objektiven Fehlerquellen ausschalten, die auf das Vergleichen der Adrenalinfluoreszenz mit oben angeführten Standardfluoreszenzen zurückzuführen waren.

ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW berichten, es sei ihnen gelungen, Adrenalin im Plasma und im Dialysat nachzuweisen. Die negativen Ergebnisse von BLOCH (S.46) und v.PORAT (S.47) mit der Dialyse-Methode und die von STAUB/KLINGLER und v.PORAT (S.49) mit der Methode nach LEHMANN/MICHAELIS erklären ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW mit der Verwendung ungenügend empfindlicher Fluorimeter und ungünstiger Adrenalin-Standardpräparate (S.53). Dieser etwas optimistischen Deutung sollte man mit Vorsicht entgegentreten: Unterscheidet sich doch die Methode nach ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW von der nach LEHMANN/MICHAELIS nur durch die Wahl eines besseren Fluorimeters. Damit wäre aber die ablehnende Haltung von STAUB/KLINGLER (S.49) auch auf die Methode nach ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW zu übertragen.

Einen entscheidenden Schritt nach vorn tat LUND (S.53), der das Adrenalin durch Adsorption an Aluminiumhydroxyd oder besser an Aluminiumoxyd (S.56/57) aus dem Blut isolierte. Die Elution des Adrenalins aus den Aluminiumsäulen erfolgte mit Essigsäure. Das Adrenalin konnte dann in Lösung bestimmt werden. Bei der Elution wurden konstant 80% des zugefügten Adrenalins wiedergefunden. Der Verlust lässt sich durch Oxydation erklären. Da er konstant war, erscheint die Multiplikation mit 1,25 als Korrektionsfaktor gerechtfertigt. Als Minimum liessen sich 0,01 μ g Adrenalin/ccm (= 1 μ g%) erfassen.

Bei den bisher angeführten Methoden und der später noch zu erwähnenden nach v.EULER/FLODING (S.75) entsteht aus Adrenalin Adrenolutin bzw. aus Noradrenalin Noradrenolutin. Das Adrenalin wird durch den Luftsauerstoff zu Adrenochrom oxydiert. Durch Zugabe von Alkali wird das Adrenochrom ohne Sauerstoff in Adrenolutin umgewandelt (S.55). Adrenolutin konnte als 1-methyl-3,5,6-Trioxindol identifiziert werden (LUND; EHRLÉN; FISCHER; S.54). Aus Noradrenalin wird analog Noradrenolutin gebildet (S.60). Adrenolutin bzw. Noradrenolutin sind die fluorescierenden Substanzen, die aus den Katechinaminen entstehen. Adrenolutin wird sehr leicht oxydiert (S.55).

Zur Zeit des Fluoreszenzmaximums liegt nur 1/4 des Adrenalins als Adrenolutin vor. Um eine quantitative Bestimmung der Katechinamine zu erreichen, ging LUND von folgenden Gedanken aus: Man müsste das Adrenalin quantitativ in neutraler oder schwach saurer Lösung zu Adrenochrom oxydieren und dann das Adrenochrom unter entsprechenden sauer-

stofffreien Bedingungen in Adrenolutin überführen. Die Oxydation gelang mit MnO_2 ; der Sauerstoff wurde mit Natriumascorbat entfernt, das eine grössere Sauerstoffaffinität besitzt als Adrenolutin. Auf diese Weise wurde alles Adrenalin quantitativ und fast sofort in Adrenolutin umgewandelt. Die so entstandene Fluoreszenz ist über 1 Stunde konstant. Entsprechend lässt sich Noradrenalin in Noradrenolutin überführen.

LUND (S.60) erreichte als erster die fluorimetrische Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin nebeneinander. Der Unterschied in der Oxydierbarkeit von Adrenalin und Noradrenalin erlaubte ihm die gleichzeitige fluorimetrische Bestimmung der beiden Substanzen. Bei pH 3 wird innerhalb von 60 sec. alles Adrenalin, aber nur 5% des Noradrenalins oxydiert. Bei pH 6,5 wird innerhalb von 20 sec. alles Adrenalin und alles Noradrenalin oxydiert. Aus der Differenz der Fluoreszenzwerte bei pH 6,5 und pH 3 lässt sich dann der Noradrenalinegehalt errechnen. Die gesuchten Werte werden nach Subtraktion der entsprechenden Leerwerte im Vergleich mit Standardlösungen erhalten. Als Minimum liessen sich 0,01 μg Adrenalin/ccm (= 1 $\mu\text{g}\%$) bzw. 0,01-0,02 μg Noradrenalin/ccm (= 1-2 $\mu\text{g}\%$) erfassen.

HELLER/SETLOW/MYLON (S.63) berichten einen beschleunigenden Einfluss des Noradrenalins auf die Adrenolutinbildung. Die Ursache dieser Erscheinung ist noch nicht geklärt. Die gleichen Autoren konnten das Fluoreszenzmaximum des Adrenalins bei 5400 $\text{\AA}$ und das des Noradrenalins bei 5200 $\text{\AA}$ ermitteln.

Blutplasma schwächt die Fluoreszenz von Adrenolutin und Noradrenolutin deutlich ab. Diese Abschwächung ist auf die Plasmaproteine zurückzuführen und wird höchstwahrscheinlich durch die SH-Gruppen der Proteinmoleküle verursacht (MYLON/ROSTON; S.65).

Die Fluoreszenz der Katechinamine ist abhängig von der Konzentration der Katechinamine (BLOCH; S.47), von der Filterung des einfallenden und des Fluoreszenzlichtes, von der Temperatur, vom Grad der Alkalinität und von der Sauerstoffkonzentration (HELLER/SETLOW/MYLON; S.65).

WEIL-MALHERBE/BONE (S.66) behandelten das Adrenalin in alkalischem Milieu mit Äthylendiamin. Dabei entsteht ein fluoreszierendes Kondensationsprodukt. Die Reaktion läuft über das Adrenochrom. Es entsteht jedoch kein Adrenolutin. Die Konstitution des Kondensationsproduktes ist noch nicht mit Sicherheit geklärt. Adrenalin wird quantitativ in das vollständig stabile Kondensationsprodukt überführt, dessen Fluoreszenz über mindestens 24 Std. konstant bleibt. Zuerst war eine Unterscheidung der Adrenalin- von der Noradrenalinfluoreszenz nicht möglich, sodass die Katechinamine als Summe bestimmt werden mussten (S.66). Als geringste nachweisbare Menge werden für diese Methode 0,001 μ /ccm genannt.

Später liess sich dann Adrenalin neben Noradrenalin nachweisen (S.72): Bei Verwendung eines Blaugrün-Filter als Filter C im Fluorimeter ist die Fluoreszenzintensität von Adrenalin und Noradrenalin fast gleich; bei Verwendung eines Gelb-Filter als Filter C ist die Fluoreszenzintensität des Adrenalins 4 1/2 mal so hoch wie die des Noradrenalins. Dieses unterschiedliche Verhalten der beiden Katechinamine erlaubt den Nachweis von Adrenalin neben Noradrenalin. Als Minimum werden 0,001 μ Adrenalin bzw. Noradrenalin/ccm erfasst.

MANGER et al. (S.74) modifizierten diese Methode. Sie wiesen Adrenalin neben Noradrenalin nach, indem sie das verschiedene Verhalten der beiden Katechinamine gegenüber Natriumthiosulfat zur Bestimmung heranzogen: Gibt man vor der Kondensation mit Äthylendiamin zu einer sauren Adrenalinlösung Natriumthiosulfat, dann wird die Fluoreszenz des Adrenalinkondensationsproduktes nicht beeinträchtigt, während die Fluoreszenz des Noradrenalinkondensationsproduktes unter gleichen Bedingungen um 22% des ursprünglichen Wertes abgeschwächt wird. Die Verwendung verschiedener Filter C war nicht nötig. Es lassen sich 0,005 μ Adrenalin bzw. Noradrenalin/ccm nachweisen.

Über die Spezifität der Fluoreszenzreaktion nach Kondensation mit Äthylendiamin gibt Tabelle 4 Auskunft (S.71). Nach den eigenen Angaben von WEIL-MALHERBE/BONE (S.70) ist diese Methode nicht so spezifisch wie die, bei denen Adreno- bzw. Noradrenolutin gebildet wird.

Aus diesem Grund griffen v.EULER/FLODING (S.76) auf die Adrenolutinfluoreszenz zurück. Sie modifizierten die Methode von LUND (S.60) nur gering. Statt MnO_2 verwendeten sie $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ als Oxydationsmittel. Bei pH 3,5 wurde innerhalb von 3 Minuten - in Gegenwart von Zinksulfat, das die Oxydation des Adrenalins beschleunigt - alles Adrenalin, aber nur 2-4 % des Noradrenalins oxydiert. Bei pH 6 wurde innerhalb von 2 Minuten alles Adrenalin und alles Noradrenalin oxydiert. Die Überführung von Adreno- bzw. Noradrenochrom in Adreno- bzw. Noradrenolutin erfolgte wie bei LUND unter dem Schutz von Ascorbinsäure. Die Katechinaminwerte liessen sich leicht berechnen. Es wurden 0,002 μg Adrenalin bzw. Noradrenalin/ccm erfasst.

Da hauptsächlich mit der Adreno- bzw. Noradrenolutinfluoreszenz gearbeitet wurde, sei noch auf die Spezifität dieser Methode hingewiesen (S.79/80). Nur die Katechinamine sind in der Lage ein Fluoreszenzprodukt aus den entsprechenden -chromen zu bilden, die eine OH-Gruppe am β -C-Atom und ein H-Atom am α -C-Atom der Seitenkette tragen. Da in biologischem Material neben Adrenalin und Noradrenalin keine nennenswerten Mengen anderer Katechinamine mit einer OH-Gruppe in der Seitenkette vorkommen dürften, darf man mit v.EULER/FLODING die Reaktion als sehr spezifisch ansprechen.

ADRENALIN UND NORADRENALIN IM MENSCHLICHEN BLUT

1. Normaler Katechinamingehalt des venösen Blutes

Die bisher mitgeteilten Werte für den Adrenalin- und Noradrenalin-gehalt des normalen venösen menschlichen Blutes sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

TABELLE 6

Adrenalin- und Noradrenalingehalt des normalen venösen Blutes

Verfasser	Bestimmung	Adrenalin γ/ccm	Noradrenalin γ / ccm	
Jørgensen (81)	fluor.	0,068	-	im Dialysat bestimmt
West (90)	fluor.	0,07	-	"
Annersten / Grönwall / Koiw (89)	fluor.	0,031-0,082	-	"
Lehmann / Michaelis (86)	fluor.	1,0-3,16	-	im Plasma bestimmt
Annersten (108)	fluor.	2,6	-	"
Annersten / Grönwall / Koiw (89)	fluor.	1,17-3,3	-	"
=====				
Lund (93)	fluor.	< 0,01	-	im Plasma bestimmt
Weil-Malherbe / Bone (103)	fluor.	0,003	-	"
Weil-Malherbe / Bone (105)	fluor.	0,002-0,003	0,004-0,005	"

JORGENSEN und WEST fanden im Dialysat $\sim 0,07 \mu$ Adrenalin/ccm, LEHMANN/MICHAELIS im Plasma $\sim 3 \mu$ Adrenalin/ccm. Die Richtigkeit der von diesen Autoren erzielten Werte ist jedoch sehr in Frage gestellt, da BLOCH (S.46) und v.PORAT (S.47) die Methode von JØRGENSEN ablehnen und STAUB/KLINGLER und v.PORAT (S.49) die Möglichkeit der Adrenalinbestimmung im Plasma mit der Methode nach LEHMANN/MICHAELIS verneinen. Auch die positive Beurteilung dieser Werte durch ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW (vgl. hierzu auch den nächsten Abschnitt) muss in Zweifel gezogen werden: Unterscheidet sich doch die Methode nach ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW nur durch die Wahl eines besseren Fluorimeters von der nach LEHMANN/MICHAELIS. Daher dürfte wohl die negative Kritik von STAUB/KLINGLER an der Methode nach LEHMANN/MICHAELIS auch auf die Methode nach ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW zu übertragen sein.

LUND konnte im normalen venösen menschlichen Blut kein Adrenalin nachweisen. Da seine Methode den Nachweis von $0,01 \mu$ /ccm erlaubt, schloss er, dass Adrenalin, wenn vorhanden, nur in geringerer Konzentration im Blute enthalten sei.

WEIL-MALHERBE/BONE teilen als Mittelwerte für das normale venöse menschliche Blut $0,002-0,003 \mu$ Adrenalin/ccm Plasma und $0,004-0,005 \mu$ Noradrenalin/ccm Plasma mit. Diese niedrigen Werte widersprechen den Angaben von LUND ($< 0,01 \mu$ /ccm) nicht, differieren aber sehr mit den hohen Werten von LEHMANN/MICHAELIS und ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW. Da jedoch die Methode nach LEHMANN/MICHAELIS (und somit auch die nach ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW) heftiger Kritik unterzogen wurde, erscheinen die niedrigen, von WEIL-MALHERBE/BONE mitgeteilten Werte als die wahrscheinlicheren. Abschliessend muss gesagt werden, dass der genaue Katechinamingehalt des normalen venösen menschlichen Blutes noch nicht bekannt ist.

2. Freies und gebundenes Adrenalin bzw. Noradrenalin im Blut

Zur Klärung der Frage, ob Adrenalin und Noradrenalin im menschlichen Blut frei oder gebunden vorliegen, seien zunächst die Untersuchungen von ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW (89, 110) in Tabelle 7 wiedergegeben. Die Dialyse erfolgte nach JØRGENSEN (81).

Tabelle 7: Adrenalingehalt im Plasma, im Dialysat und im nicht-dialysierten Plasma (ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW, 89)

Anzahl d.Fälle	Adrenalingehalt des Plasmas vor der Dialyse in μ /ccm	Adrenalin nach 4 Std. Dialyse in μ /ccm		% Adr.im Dialysat
		im nicht-dialy- sierten Plasma	im Dialysat	
10	1,17-3,3	1,13-2,91	0,031-0,082	2,5-3,1

Im Plasma blieben etwa 97% des Adrenalins -nach Meinung der Autoren- proteingebunden zurück, während ein sehr kleiner Teil (etwa 3%) im Dialysat nachgewiesen werden konnte. Im einen Fall (Plasma) werde freies und gebundenes Adrenalin bestimmt, im anderen Fall (Dialysat) nur freies Adrenalin. Das proteingebundene Adrenalin werde infolge seiner Bindung am Dialysieren gehindert. Die Werte für das Dialysat stimmen gut mit denen von JØRGENSEN und WEST (Tab.6) überein, die für das Plasma mit denen von LEHMANN/MICHAELIS (Tab.6). ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW fassen ihre Meinung schliesslich zusammen: "Die verschiedenen Angaben über den Adrenalingehalt des Blutes sind wahrscheinlich auf die verschiedenen angewandten Methoden zurückzuführen. Nach unseren Versuchen (Tab.7) lässt sich feststellen, dass Adrenalin teils in freier dialysierbarer Form und teils in nicht-dialysierbarer an Proteine gebundener Form im Blut vorkommt. Dies erklärt den Unterschied zwischen den hohen Werten von LEHMANN/MICHALIS und den niedrigen Werten der Dialysemethode (JØRGENSEN, WEST) sowohl quantitativ wie prinzipiell."

LUND(93) schreibt jedoch 1949, es lasse sich noch keine sichere Antwort auf die Frage geben, wieviel Adrenalin im Blut frei und wieviel gebunden vorläge.

WEIL-MALHERBE/BONE (105) unterwarfen dann 1954 das Plasma der Hydrolyse mit 2 n-HCl. Da weder der Adrenalin- noch der Noradrenalinwert anstieg, folgerten sie: Man darf annehmen, dass im Plasma keine proteingebundene Adrenalin- bzw. Noradrenalinfraktion enthalten ist.

3. Arterio-venöse Differenz von Adrenalin und Noradrenalin

Bei 6 Menschen bestimmten WEIL-MALHERBE/BONE (105) die arterio-venöse Differenz des Adrenalin- und Noradrenalingehaltes (Tab.8).

Tabelle 8: Arterio-venöse Differenz des Adrenalin- und Noradrenalin-gehaltes im menschlichen Plasma.

A = arterielles Blut. V = venöses Blut.

Δ = arterio-venöse Differenz (WEIL-MALHERBE/BONE, 105)

Fall	Adrenalin μ g / 1 Plasma			Noradrenalin μ g / 1 Plasma		
	A	V	Δ	A	V	Δ
1	3,26	2,20	1,06	5,38	6,82	-1,44
2	3,68	2,73	0,95	6,44	5,58	0,86
3	3,76	3,10	0,66	4,40	4,60	-0,20
4	3,80	3,30	0,50	4,40	6,92	-2,52
5	2,49	1,77	0,72	6,32	5,65	0,67
6	2,47	1,87	0,60	6,15	4,98	1,17

Die arterielle Adrenalinkonzentration war in allen 6 Fällen höher als die venöse. Die Noradrenalinkonzentration war in 3 Fällen im arteriellen, in 3 Fällen im venösen Blut höher.

4. Adrenalin- und Noradrenalingehalt menschlicher Erythrozyten

Da LUND (93) 1949 die gleichen Adrenalinwerte für Plasma und hämolyisiertes Blut gleicher Blutproben feststellte, konnte er die Hypothese von WEST (1947) (90) nicht bestätigen, dass das Adrenalin hauptsächlich in den Blutkörperchen gefunden werde. 1953 untersuchten WEIL-MALHERBE/BONE (104) Plasma und Erythrozyten getrennt auf ihren Katechinamingehalt. Die Erythrozyten wurden abzentrifugiert und hämolysiert. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 9. Die Werte werden in $\mu\text{g}/1$ Gesamtblut angegeben, nicht in $\mu\text{g}/1$ Plasma.

Tabelle 9: Adrenergische Amine im normalen venösen menschlichen Blut (WEIL-MALHERBE/BONE, 104)

Geschlecht	Blut- fraktion	Zahl d. Fälle	Adrenalin $\mu\text{g}/1$	Noradrenalin $\mu\text{g}/1$
♂	Plasma	22	$1,18 \pm 0,004$	$5,29 \pm 0,233$
	Erythr.	22	$2,81 \pm 0,065$	$2,02 \pm 0,14$
♀	Plasma	21	$1,46 \pm 0,082$	$5,16 \pm 0,16$
	Erythr.	21	$2,28 \pm 0,14$	$3,77 \pm 0,12$

Bei beiden Geschlechtern ist die Adrenalinkonzentration am höchsten in den Erythrozyten und die Noradrenalinkonzentration am höchsten im Plasma. Männliches und weibliches Plasma enthalten etwa 5 mal soviel Noradrenalin wie Adrenalin. Die männlichen Erythrozyten enthalten mehr Adrenalin als Noradrenalin, die weiblichen mehr Noradrenalin als Adrenalin.

5. Adrenalin- und Noradrenalingehalt menschlicher Thrombozyten

1954 machten WEIL-MALHERBE/BONE (111) die Mitteilung, dass ein Teil der Katechinamine im Blut an die Thrombozyten gebunden sei. Die Werte lassen sich aus Tabelle 10 entnehmen.

Tabelle 10: Adrenalin und Noradrenalin ($\mu\text{g}/\text{l}$) in thrombozytenreichem und thrombozytenarmen Plasma (WEIL-MALHERBE/BONE 111)

	Bestimmt nach (104) WEIL-MALHERBE/BONE		Bestimmt nach LUND (97)	
	A	N	A	N
Blut in $\text{NaF-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung	1,46	3,70	1,56 ⁺	5,40 ⁺
Plasma zentrifugiert mit 600 U	1,47	4,25	2,37	2,96
Plasma zentrifugiert mit 3000 U	0,34	1,20	0,36	1,17
Rückstand bei 3000 U	0,72	2,11	+ = Blutprobe an einem anderen Tag entnommen (gleicher Mensch)	

6. Adrenalingehalt des Blutes unter verschiedenen Bedingungen.

WEIL-MALHERBE/BONE (103) gaben weiterhin an:

- a) Elektrische Reizung des Gehirns mit äusseren Elektroden lässt den Adrenalin Spiegel im Plasma bis zu 100% steigen, gleich ob Krämpfe auftreten oder nicht.
- b) Allgemeine Narkose lässt den Adrenalinwert bis auf 40% des Anfangswertes fallen.
- c) Entgegen einer weitverbreiteten Meinung falle der Adrenalin Spiegel des Blutes ganz deutlich bei Insulin-Hypoglykämie. Dieses Phänomen entwickle sich vollständig innerhalb 30 min. nach der intramuskulären Insulininjektion, lange bevor das Bewusstsein getrübt werde. Der Effekt beruhe nicht auf einer Erschöpfung des adrenergischen Systems, da eine intravenöse Injektion von Glutaminsäure oder elektrische Reizung des Gehirns während des hypoglykämischen Komas zu einem deutlichen Anstieg des Adrenalingehaltes im Blut führe.

HOLZBAUER/VOGT (112) stellten jedoch 1954 im Gegensatz zu WEIL-MELHERBE/BONE ein Ansteigen des Adrenalinblutspiegels nach intravenösen Insulingaben fest (vgl. Insulin-Hypoglykämie S.103).

7. Katechinamingehalt des Blutes bei Phaeochromozytomen.

1950 untersuchte LUND (97, 113) Blutproben von 5 phaeochromozytom-verdächtigen Patienten. Der Katechinaminspiegel war deutlich erhöht. Bei 4 Patienten konnte ein Phaeochromozytom entfernt werden. 1 Patient starb vor der Operation; die Sektion ergab keinen Anhalt für ein Phaeochromozvtom.

Nach LUND ist die Diagnose auf ein Phaeochromozytom streng angezeigt, wenn das venöse Blut von Hochdruckpatienten leicht nachweisbare Mengen von Adrenalin und/oder Noradrenalin enthält, d.h. mehr als 0,01 µg/ccm Plasma.

Zusammenfassender Überblick

Als Durchschnittswerte der Katechinaminkonzentration im normalen venösen menschlichen Blut werden von den verschiedenen Autoren verschiedene Werte genannt. Den hohen Werten von LEHMANN/MICHAELIS und ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW ($\sim 3 \mu\text{g}$ Adrenalin/ccm) stehen die niedrigen Werte von WEIL-MALHERBE/BONE (0,002-0,003 μg Adrenalin/ccm bzw. 0,004-0,005 μg Noradrenalin/ccm) gegenüber. Die Angaben von LUND ($< 0,01 \mu\text{g}$ /ccm) dürften letzteren kaum widersprechen. Da die Methode nach LEHMANN/MICHAELIS (und somit auch die nach ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW) heftig kritisiert wurde, erscheinen die niedrigen, von WEIL-MALHERBE/BONE mitgeteilten Werte als die wahrscheinlicheren. Abschliessend muss gesagt werden, dass der genaue Katechinamingehalt des Blutes noch nicht bekannt ist.

ANNERSTEN/GRÖNWALL/KOIW fanden, dass der grösste Teil des Adrenalins (97%) im Blut an Proteine gebunden sei, während nur ein kleiner Teil (3%) frei vorliege. LUND zieht diese Angaben sehr in Zweifel und WEIL-MALHERBE/BONE verneinen das Vorkommen einer proteingebundenen Adrenalin- bzw. Noradrenalinfraktion im Plasma.

Nach den Angaben von WEIL-MALHERBE/BONE sind die Katechinamine auch in den Erythrozyten und in den Thrombozyten nachzuweisen und es unterscheidet sich der arterielle vom venösen Katechinamingehalt.

Die Aussage von WEIL-MALHERBE/BONE, der Adrenalin Spiegel des Blutes falle bei Insulin-Hypoglykämie deutlich ab, wird von HOLZBAUER/VOGT abgelehnt, da diese Autoren ein Ansteigen des Adrenalinblutspiegels nach intravenösen Insulingaben feststellen mussten.

LUND gibt noch einen wichtigen Hinweis für die Diagnose von Phaeochromozytomen: Wenn das venöse Blut von Hochdruckpatienten leicht nachweisbare Mengen von Adrenalin und/oder Noradrenalin enthält, d.h. mehr als 0,01 μg /ccm Plasma, dann sei die Diagnose auf ein Phaeochromozytom streng angezeigt.

ADRENALIN UND NORADRENALIN IM MENSCHLICHEN URIN

A. Urinaufbereitungsmethoden

Zur Bestimmung des Adrenalin- und Noradrenalingehaltes des Urins muss man die Katechinamine aus dem Urin isolieren. Die bisher mitgeteilten Methoden seien kurz beschrieben.

1. Methode nach v.EULER/HELLNER (7)

Durch Säurehydrolyse des Urins werden die gebundenen Katechinamine in Freiheit gesetzt. Die freien Katechinamine werden im nicht-hydrolysierten, die Gesamt-Katechinamine im hydrolysierten Urin bestimmt. Die Katechinamine werden an niedergeschlagenes Aluminiumhydroxyd adsorbiert und aus diesem mit Äthanol-Aceton eluiert. 75% der Katechinamine werden erfasst.

a) Sammeln des Urins:

Leicht saurer Urin, der 48 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt wird, zeigt im biologischen Versuch einen Aktivitätsverlust von 20%. Dagegen wird keine Veränderung beobachtet, wenn man die Proben 48 Std. in den Kühlschrank stellt. Wird der Urin durch Säurezugabe auf pH 3-4 gebracht und dann 48 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt, erhält man dennoch den erwähnten Aktivitätsverlust. Dies zu wissen ist wichtig, wenn man von auswärts zugesandte Urinproben zu untersuchen hat. Um einen Aktivitätsverlust zu verhindern, muss man daher den Urin im Kühlschrank sammeln.

b) Säurehydrolyse des Urins:

Will man im Urin neben den freien Katechinaminen auch die als Estersulfate (114, 115) und Glukuronide (116) gebundenen Katechinamine erfassen, dann muss man den Urin der Säurehydrolyse mit H_2SO_4 (oder einer anderen Säure) unterwerfen.

Über pH 2 werden die gebundenen Katechinamine nicht genügend in Frei-

heit gesetzt. Am günstigsten erwies sich Hydrolyse bei pH 1,5 20 min. lang bei 100° C. Während der Hydrolyse nimmt die Acidität gewöhnlich etwas ab; man muss daher durch weitere Säurezugabe das pH konstant auf 1,5 halten. Die biologische Aktivität hydrolysierten Urins ist gegenüber der nicht-hydrolysierten Urins etwas erhöht. Die milde Hydrolyse wurde gewählt, um die Inaktivierung der freien Katechinamine durch Razematbildung so gering als möglich zu halten.

c) Aufbereitung des Urins:

Der 24-Stunden-Urin wird gesammelt (während des Sammelns in den Kühlschrank gestellt) und mit HCl oder H_2SO_4 versetzt, um pH 3-4 zu erhalten, das geeignet ist, eine Inaktivierung der Katechinamine zu verhindern. 300 ccm des 24-Stunden-Urins werden mit H_2SO_4 bis pH 3 versetzt und dann 1-2 ccm 20% Aluminiumsulfat pro 100 ccm Urin zugegeben. Anschliessend wird 0,5 n NaOH eingetropft bis pH 7,6 erreicht und die Aluminiumhydroxydbildung vollständig ist. Der Niederschlag wird abfiltriert, 2 mal mit Aqua dest. ausgewaschen und dann in 2 n H_2SO_4 aufgelöst und auf pH 3,5 gebracht. Schliesslich wird das 4-fache Volumen Äthanol-Aceton (1:1) zur Elution der Katechinamine zugegeben; dabei werden die Aluminiumsalze niedergeschlagen. Die Lösung wird für einige Stunden im Kühlschrank aufbewahrt, darauf gefiltert, und das Filtrat im Vakuum bei niedriger Temperatur auf ein kleines Volumen eingedampft. Vom Endextrakt (pH 3,5-4) entspricht je nach Konzentration 1 ccm Extrakt 25-50 ccm der Urinproben. Bei der Extraktion werden 75% der Katechinamine wiedergefunden. Für die Verluste während der Herstellung der Extrakte wird keine Korrektur vorgenommen.

BISCHOFF/NUZUM (117) übten 1953 an der Urinaufbereitungs-Methode nach v.EULER/HELLNER (7) Kritik, da diese die Aluminiumadsorption bei pH 7,6 durchführten. Nachdem nun einmal die Instabilität des Adrenalins bei alkalischem pH bekannt sei, müsse jede Methode kritisiert werden, die pH 7 nach der alkalischen Seite überschreitet. Diese Kritik erscheint nicht berechtigt, da einerseits v.EULER/HELLNER (7) selbst angeben, dass ihre Urinaufbereitungs-Methode nur 75% der Katechinamine erfasst und andererseits 1953 schon die Untersuchungen LUNDS (93) über das optimale Adsorptions-pH (siehe S.57) vorlagen.

2. Methode nach GOLDENBERG/SERLIN/EDWARDS/RAPPORT (118)

Die Methode nach v.EULER/HELLNER (7) wurde leicht modifiziert. Der Urin wird der Säurehydrolyse unterworfen, um die gebundenen Katechinamine in Freiheit zu setzen. Die Gesamt-Katechinamine werden an niedergeschlagenes Aluminiumhydroxyd adsorbiert und aus diesem mit Aceton-Alkohol eluiert.

a) Sammeln des Urins:

Der 24-Stunden-Urin wird unter Zusatz von 10 ccm 6 n HCl gesammelt. Kühl bei pH 3,5 aufbewahren. Der Patient erhält keine Medikamente, besonders keine Vitaminpräparate, um Abweichungen bei der fluorimetrischen Bestimmung zu verhindern.

b) Säurehydrolyse des Urins:

Eine Probe von 525 ccm des angesäuerten Urins wird filtriert und das Filtrat unter Zugabe von 6 n HCl auf pH 1,5-2,0 gebracht. 15 Minuten auf 100°C erhitzen, pH-Wert prüfen, nochmals 15 Minuten erhitzen und dann auf Zimmertemperatur abkühlen.

c) Aufbereitung des Urins:

Zu etwa 510 ccm hydrolysierten Urins (entspricht 500 ccm normalem Urin) werden 7,5 ccm einer 20% wässrigen Aluminium-Sulfatlösung gegeben. Unter tropfenweisem Zusatz von 5 n NaOH wird pH 7,6-7,8 eingestellt (genaue Messung mit einem Pontentiometer notwendig). Der Niederschlag bildet sich bei pH 4-6. Ist bei pH 7 noch kein Niederschlag ausgefallen, muss man weiteres Aluminiumsulfat zugeben. Um die Katechinamine vollständig zu adsorbieren, muss genügend Aluminiumhydroxyd anwesend sein; dagegen schwächt zu viel Adsorbens die Empfindlichkeit der Methode ab, weil dann zu viel Urin in dem gelatinösen Niederschlag enthalten ist. Der Niederschlag wird sofort gesammelt, indem man 15 Minuten zentrifugiert (1800 U/Min.) Die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen, der gesamte Niederschlag in eine Flasche gebracht und in 30 ccm Kochsalzlösung suspendiert (500 ccm Kochsalzlösung + 1 ccm 0,2 m Phosphatpuffer; pH 7,8). Die Suspension wird 30 Minuten zentrifugiert (1800 U/Min.), die überstehende Flüssigkeit abgegossen, wenn sie klar ist. Der Niederschlag hat dann ein Volumen von 10-20 ccm. Ist das Volumen kleiner als 10 ccm, dann war nicht genügend Aluminiumsulfat vor-

handen, und die Niederschlagsbildung wird am besten wiederholt. Nun wird der gelatinöse Niederschlag in möglichst wenig δ n H_2SO_4 aufgelöst (gewöhnlich 2,5-3 ccm). Über Nacht kühl stellen. Am Morgen wird der pH-Wert der Mischung auf 3,5-3,9 gebracht, (durch tropfenweise Zugabe von 5 n NaOH bis pH 3, und dann mit 1 n NaOH bis pH 3,5-3,9) ausgeführt in einer 250 ccm Flasche. Dann wird das Volumen der Mischung festgestellt, indem der tiefere 5 ccm-Strich abgelesen wird. Nun gibt man das 4-fache Volumen einer Lösung von Aceton: 95% Alkohol (1:1) hinzu. Gut schütteln und über Nacht auf 4°C abkühlen. Am nächsten Morgen wird die Mischung 30 Minuten zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit vorsichtig abgegossen. Der Rückstand wird nochmals ausgewaschen, indem 30 ccm der Aceton: 95% Alkohol-Lösung (1:1) zugegeben werden, umrühren bis homogene Lösung, und dann nochmals zentrifugieren. Die überstehende Flüssigkeit wird zu der vorhin abgegossenen gegeben; beide zusammen werden sorgfältig auf ein Volumen von 1-2 ccm im Vakuum eingedampft. (Dieser Rest wird mit einer kleinen Menge Aceton: 95% Alkohol (1:1) umgerührt und in eine 25 ccm-Flasche gebracht, dann wiederum im Vakuum bei 45°C konzentriert.) Der nun erhaltene Rest wird in ein 5 ccm-Röhrchen eingefüllt. Das Röhrchen wird mit 0,01 n HCl bis zum 5 ccm-Strich aufgefüllt, wenn die Katechinamine biologisch bestimmt werden sollen. Zur papierchromatographischen Bestimmung der Katechinamine wird das Röhrchen mit 95% Alkohol, der 1 ccm konzentrierte Salzsäure auf 100 ccm enthält, auf 5 ccm aufgefüllt.

3. Methode nach v. EULER/ORWÉN (119)

1955 veröffentlichten v. EULER/ORWÉN eine Modifikation der Urinaufbereitungsmethode nach v. EULER/HELLNER (7). Durch Säurehydrolyse des Urins werden die gebundenen Katechinamine in Freiheit gesetzt. Die freien Katechinamine werden im nicht-hydrolysierten, die Gesamt-Katechinamine im hydrolysierten Urin bestimmt. Die Katechinamine werden an Aluminiumoxyd adsorbiert und aus diesem mit Schwefelsäure oder Oxalsäure eluiert. 80% der Katechinamine werden erfasst.

a) Sammeln des Urins wie bei v. EULER/HELLNER (7) (S. 94).

b) Säurehydrolyse des Urins wie bei v. EULER/HELLNER (7) (S. 94).

c) Aufbereitung des Urins:

Vorbemerkungen: Als optimale Menge des benötigten Aluminiumoxyds wurden 2,5 g Al_2O_3 für 100 ccm normalen Urin (1-1,5 l Urin/24 Std) gefunden. Das von LUND (93) und PEKKARINEN (120) mitgeteilte optimale Adsorptions-pH von 8,5 wurde gewählt. Bei einem höheren pH werden die Katechinamine leicht oxydiert und inaktiviert. Der Verlust durch Oxydation ist am geringsten, wenn das Al_2O_3 dem Urin vor dem Alkalisieren zugesetzt wird. Zum Alkalisieren eignet sich am besten NaOH . Na_2CO_3 drückt die Werte.

Spezifität der Adsorption an Aluminiumoxyd: Einige Phenyl- und Oxyphenylamine wurden der Adsorption an Aluminiumoxyd unterworfen und dann gesucht. Nur ein geringer Prozentsatz von Ephedrin und Tyramin wurde wiedergefunden. Die Adsorption ist offensichtlich spezifisch für Dioxyphenylverbindungen. Die Katechinamine sind im Eluat bei Zimmertemperatur 48 Stunden, im Kühlschrank ($+3^\circ\text{C}$) 1 Woche und in der Tiefkühlbox (-23°C) 1 Monat ohne Aktivitätsverlust stabil. Organextrakte wurden mit 5% Trichloressigsäure gewonnen. 100-200 ccm der Extrakte werden mit 2,5 g Al_2O_3 versetzt und dann wie die Urinproben aufgearbeitet.

Der Urin von 2 Stunden (50-200 ccm) wird verwendet. Mit HCl auf pH 3 bringen, bis zum Kochen erhitzen und wenn nötig filtern. Dann in einen 250-500 ccm Becher schütten; 2,5 g Al_2O_3 (für chromatographische Zwecke) zugeben. Während mit einem magnetischen Rührwerk dauernd gemischt wird, wird 0,5 n NaOH eingetropft, bis das pH um 7 liegt (wird gut angezeigt, wenn man vorher 0,05 ccm 1% Bromthymolblau dem Urin zugesetzt hatte). Weitere NaOH -Lösung eintropfen, bis pH 8,5 erreicht ist (mit Bromthymolblau-Papier prüfen). Man lässt absedimentieren und filtriert dann durch einen Saugtrichter von 5 ccm Durchmesser. 2 Blatt Filtrierpapier (Munktell 1F) geben eine gute Filtrationsgeschwindigkeit. Das Al_2O_3 wird 2 mal mit 10-20 ccm Aqua dest. ausgewaschen und fast trocken gesaugt. Die Filtrate werden weggeschüttet. Der Büchner-Trichter wird dann an eine schmale Saugflasche angeschlossen und 5 ccm 0,25 n H_2SO_4 werden zugefügt. Nachdem das Al_2O_3 mit der H_2SO_4 gut durchgemischt ist, wird mildes Saugen

angesetzt, bis das Eluat durchgefiltert ist. Die Prozedur wird mit 4 ccm H_2SO_4 wiederholt. Optimale Elutionszeit je 1 Minute. Zu dem Eluat werden 0,05 ccm 1% Bromphenolblau gegeben und das pH mit 10% Natriumbicarbonat auf pH 4 gebracht. Das Volumen wird mit Aqua dest. in einem graduierten Röhrchen auf 10 ccm aufgefüllt. Die Schwefelsäureeluate kann man sofort biologisch (8) austesten. Wird nach PEKKARINEN (120) mit 0,5 n Oxalsäure eluiert, dann eignet sich das Eluat zur fluorimetrischen Bestimmung nach v.EULER/FLODING (107). Die Methode erfasst 80% der Katechinamine. Sollte der Urin zufällig (in seltenen Fällen) grosse Mengen Histamin enthalten, dann kann ein kleiner Teil des Histamins mit in den Extrakt kommen. Wenn man dann biologisch bestimmt, muss man das Histamin durch ein Antihistaminicum (z.B. Phenergan) ausschalten.

B. Katechinamin-Ausscheidung in Urin unter normalen Bedingungen

RICHTER (114) zeigte 1940, dass Adrenalin und Noradrenalin nach oraler und parenteraler Zufuhr im menschlichen Urin teils gebunden als Sulfatester ausgeschieden werden, was durch BEYER/SHAPIRO 1945 (115) bestätigt werden konnte. CLARK et al. (116) teilten mit, dass ein Teil der Katechinamine in gebundener Form als Glukuronide im menschlichen Urin ausgeschieden wird. HOLTZ/CREDNER/KRONEBERG (121) wiesen als erste die Katechinamine im normalen menschlichen Urin nach und sprachen auf Grund biologischer Analyse die Vermutung aus, dass das von ihnen gefundene "Urosympathin" aus Adrenalin, Noradrenalin und Oxytyramin bestünde. Diese Annahme konnten v.EULER/HELLNER (7) bestätigen. Aus ihren Versuchen -die Katechinaminwerte säurehydrolysierten Urins waren höher als die nicht-hydrolysierten Urins- ergab sich, dass die Katechinamine teils in freier Form und teils in gebundener Form (als Estersulfate und Glukuronide, s.o.) im Urin ausgeschieden werden. Je nachdem, ob man hydrolysierten oder nicht-hydrolysierten Urin untersucht, werden die Gesamt-Katechinamine oder nur die freien Katechinamine erfasst. Aus der Differenz dieser beiden Werte

ergibt sich der Wert für die gebundenen Katechinamine. In ihrer Arbeit vernachlässigten v.EULER/HELLNER den Oxytyramingehalt des menschlichen Urins, da Oxytyramin nur $1/50 - 1/100$ der Aktivität des Noradrenalins auf den Katzenblutdruck und nur $1/10 - 1/20$ der Aktivität des Noradrenalins auf den Hühnerblinddarm besitzt. Als Durchschnittswerte (Urinaufbereitung nach v.EULER/HELLNER (7), biologische Bestimmung nach v.EULER(7,8)) geben sie an: im normalen menschlichen Urin werden ausgeschieden:

Gesamt-Adrenalin	10 μ / 24 Std.
Gesamt-Noradrenalin	30 μ / 24 Std.

Als dann KRONEBERG/SCHÜMANN (122) die Meinung vertraten, dass Noradrenalin den Hauptanteil der Katechinamine im menschlichen Urin stelle, widerlegten v.EULER/HAMBERG (64) diese Angaben, indem sie den Gesamt-Oxytyramingehalt des normalen menschlichen Urins zu

0,1-0,2 mg Oxytyramin / 24 Stunden

bestimmten. Mithin bildet Oxytyramin den Hauptanteil der Katechinamine im menschlichen Urin. Wegen der geringen biologischen Aktivität des Oxytyramins wird jedoch der Oxytyraminwert meist vernachlässigt.

PEKKARINEN/PITKÄNEN (123) (Adsorption der Katechinamine an Aluminiumoxyd, Elution mit Oxalsäure, Bestimmung der Adreno- bzw. Noradrenolutfloreszenz; 70-80 % der Gesamt-Katechinamine werden erfasst) teilten als normal eine Ausscheidung von

81 (31-185) μ Noradrenalin-Äquivalente/24 Stunden

im Urin mit. Da die Werte in Noradrenalin-Äquivalenten angegeben sind, sind sie, wie die Autoren selbst schreiben, etwas höher, als wenn man Adrenalin und Noradrenalin getrennt bestimmt.

v.EULER/HELLNER - BJÖRKMAN/ORWÉN (124) untersuchten 1955 14 Personen und fanden als normale Katechinamin-Ausscheidung im Urin die in Tabelle 11 mitgeteilten Werte (Urinaufbereitung nach v.EULER/ORWÉN (119), biologische Bestimmung nach v.EULER (7,8)).

Tabelle 11: Normale Katechinamin-Ausscheidung im Urin
(nach v.EULER/HELLNER-BJÖRKMAN/ORWÉN, 124)

Freies Adrenalin	4,3 (1,6 - 8,0) μ / 24 Std.
Gesamt-Adrenalin	9,5 (3,6 - 17) μ / 24 Std.
Freies Noradrenalin	27,0 (10 - 50) μ / 24 Std.
Gesamt-Noradrenalin	60,5 (22 - 129) μ / 24 Std.

Über die tageszeitlichen Schwankungen der Katechinamin-Ausscheidung im Urin gibt Tabelle 12 nach v.EULER/HELLNER-BJÖRKMAN/ORWÉN (124) Auskunft. Die Katechinamin-Ausscheidung im Urin ist in den Nachtstunden deutlich vermindert.

Tabelle 12: Tageszeitliche Schwankungen der Katechinamin-Ausscheidung im Urin
(nach v.EULER/HELLNER-BJÖRKMAN/ORWÉN, 124).

	Tagesstunden (8.00 - 23.00)	Nachtstunden (23.00 - 8.00)
Freies Adrenalin	4,6 m μ /min	1,2 m μ /min
Gesamt-Adrenalin	8,7 m μ /min	4,2 m μ /min
Freies Noradrenalin	23,0 m μ /min	9,8 m μ /min
Gesamt-Noradrenalin	47,5 m μ /min	33,5 m μ /min

1955 wiesen v.EULER/v.EULER/FLODING (125) daraufhin, dass sich die Äthylendiamin-Methode nach WEIL-MALHERBE/BONE (104) zu fluorimetrischen Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin im Urin nicht eignet. Äthylendiamin bildet nämlich auch mit Oxytyramin, 3,4-Dioxyphenylessigsäure und anderen sauren Brenzkatechinen fluorescierende Substanzen, die einen erhöhten Katechinamingehalt des Urins vortäuschen können. Diese Kritik nahm WEIL-MALHERBE (1956) (126) zum Anlass, nach einem Weg zu suchen, der doch die fluorimetrische Bestimmung der Katechinamine im Urin mit Hilfe der Äthylendiamin-Kondensation erlaubt. Saure und basische Katechin-Verbindungen konnten entweder durch Anionen- oder durch Kationen-Austauscher getrennt werden. Die basische Fraktion wurde in einem hohen Reinheitsgrad erhalten durch Adsorption an einen Kationen-Austauscher in der H^+ -Form

(zeokarb 225, water regain 1.8, 40-70 mesh) und aus diesem mit 0,2 m-BaCl₂ eluiert. Vor der Kunstharz-Behandlung wird der Urin durch eine Aluminiumsäule bei pH 8,5 geschickt und aus dieser die Katechinfraction mit Säure eluiert. In der basischen Fraktion fanden sich als Stoffe, die bei Kondensation mit Äthylendiamin gelbgrüne Fluoreszenz geben, nur Adrenalin, Noradrenalin und Oxytyramin. WEIL-MALHERBE bestimmte dann mit der Äthylendiamin-Kondensation den Gesamtwert an Adrenalin, Noradrenalin und Oxytyramin. Von diesem Gesamtwert wurden die nach LUND (97) oder v.EULER/FLODING (107) bestimmten Adrenalin- und Noradrenalinwerte abgezogen. Die Differenz ergab den Oxytyraminwert. Folgende Werte werden von WEIL-MALHERBE als normal mitgeteilt:

Gesamt-Adrenalin	11,2 $\pm$ 0,89	♂ / 1 Urin
Gesamt-Noradrenalin	24,8 $\pm$ 1,68	♂ / 1 Urin
Gesamt-Oxytyramin	82,3 $\pm$ 12,3	♂ / 1 Urin

C. Katechinamin-Ausscheidung im Urin unter verschiedenen Bedingungen

Nachdem bekannt war, dass die Katechinamine unter normalen Bedingungen im Urin ausgeschieden werden, lag die Frage nahe, wie ändert sich der Katechinamingehalt des Urins unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen. Über die Vielzahl der Untersuchungen sei in den folgenden Abschnitten berichtet.

1. Infusion von Noradrenalin.

Wird Noradrenalin normalen Patienten infundiert, dann werden nach v.EULER/LUFT (127) 1,5-3,3% der infundierten Menge im Urin ausgeschieden. Eine bedeutende Änderung der Adrenalin-Ausscheidung kann dabei nicht festgestellt werden.

2. Muskularbeit.

Die Katechinamin-Ausscheidung ist von dem Grad der Aktivität des betreffenden Individuums sehr abhängig. Normal werden im Urin etwa 10 μ g Adrenalin/24 Stunden und 30 μ g Noradrenalin/24 Stunden ausgeschieden. Bei schwerer körperlicher Anstrengung steigt sowohl die Adrenalin- wie die Noradrenalin-Ausscheidung bis auf das 10-fache der Norm an (v. EULER/HELLNER, 1952) (128).

3. Insulin-Hypoglykämie.

Schon lange wurde angenommen, dass Insulin-Hypoglykämie zu einem erhöhten Auswurf von Adrenalin aus dem Nebennierenmark führt. In Versuchen konnte an gesunden Menschen gezeigt werden, dass bei einer Gabe von 0,1 IE Insulin/kg Körpergewicht die Adrenalin-Ausscheidung auf das 10-fache der Norm anstieg, während die Noradrenalin-Ausscheidung geringfügig vermindert war (v. EULER, 1952) (129).

4. Hypertension.

HAMILTON/LITCHFIELD/PEART/SOWRY (9) fanden bei 28 Patienten mit essentiellern Hochdruck als höchste Ausscheidung 70 μ g Adrenalin + Noradrenalin/24 Stunden.

GOLDENBERG/SERLIN/EDWARDS/RAPPORT (118) wiesen bei 35 Patienten mit essentiellern Hochdruck als höchste Ausscheidung 100 μ g Noradrenalin-Äquivalente/24 Stunden nach.

1954 untersuchten v. EULER/HELLNER/PURKHOLD (130) 500 Patienten mit essentiellern Hochdruck. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 13.

Tabelle 13: Noradrenalin-Ausscheidung im Urin bei 500 Patienten mit essentiellern Hochdruck
(v. EULER/HELLNER/PURKHOLD, 130).

TABELLE 13

Noradrenalin-Ausscheidung im Urin bei 500 Patienten mit essentiellern Hochdruck
(v. EULER / HELLNER / PURKHOLD, 130)

Noradrenalin - Ausscheidung µ/ 24 Std.	Zahl			% Zahlen aller Fälle			
	♀	♂	gesamt	♀	♂	gesamt	
< 28,8	85	42	127	24,9	26,4	25,4	66,2 %
28,8 - 57,6	134	70	204	39,5	44,0	40,8	
57,6 - 86,4	67	20	87	19,6	12,6	17,4	
86,4 - 115	26	14	40	7,6	8,0	8,0	16,4 %
115 - 144	9	9	18	2,6	5,7	3,6	
144 - 173	9	2	11	2,6	1,3	2,2	
> 173	11	2	13	3,2	1,2	2,6	
Insgesamt	341	159	500			100,0	

Aus Tabelle 13 kann ersehen werden, dass 66,2 % der Patienten eine Noradrenalin-Ausscheidung von weniger als 57,6 µ/24 Stunden aufwiesen; das ist also normal. Die Gruppe mit 57,6 - 86,4 µ/24 Stunden wurde als noch nicht bedeutend erhöht betrachtet. Trotzdem bleibt eine Gruppe von 16,4 % (82 Patienten), bei denen die Noradrenalin-Ausscheidung sichtlich erhöht war (> 86,4 µ/24 Stunden). Die Autoren nehmen zu ihren Untersuchungen wie folgt Stellung: Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stimmen mit denen von GOLDENBERG (1951) (131) und BURN (1953) (132) überein, die berichten, dass in der Mehrzahl der Fälle mit essentiellern Hochdruck die Noradrenalin-Ausscheidung im Urin sich in normalen Grenzen hält. Unsere Ergebnisse widersprechen jedoch den Untersuchungen von HOLTZ/CREDNER/KRONENBERG (1947) (121), die bei

essenziellem Hochdruck gewöhnlich eine erhöhte Ausscheidung im Urin fanden. Die 16,4 % - Gruppe mit erhöhter Noradrenalin-Ausscheidung bei unseren Versuchen darf nicht übersehen werden. Man könnte vermuten, dass eine erhöhte Noradrenalin-Ausscheidung (und vorher natürlich Noradrenalinbildung) für die Pathogenese eines Teiles der essentiellen Hochdruck-Fälle von Bedeutung ist.

5. Adrenalektomie.

Nach Adrenalektomie (HELLSTRÖM/v. EULFR/FRANKSON/GEMZELL, 1952) (133) fiel in den meisten Fällen der Adrenalin-Wert im Urin auf Null ab, während der Noradrenalin-Wert fast normal blieb. Diese Beobachtung rechtfertigt die Annahme, dass praktisch alles Adrenalin, das im Urin ausgeschieden wird, im Nebennierenmark entsteht, während Noradrenalin einen anderen Ursprungsort haben muss.

6. Endokrine Störungen.

ACTH- und Cortison-Behandlung (auf längere Zeit) bringen ein Fallen der Noradrenalin-Ausscheidung mit sich (LUFT/v. EULER, 1951) (134), während die Adrenalin-Ausscheidung sich dabei nicht ändert. Die Folge davon ist, dass der relative Adrenalin-gehalt im Urin steigt (manchmal bis zu 100%). DOCA-Behandlung gibt keine Änderung der Katechinamin-Ausscheidung im Urin.

7. Coronarthrombose.

FORSSMAN/HANSON/JENSEN (1952) (135) konnten beobachten, dass in Fällen akuter Coronarthrombose die Noradrenalin-Ausscheidung im Urin oft stark anstieg, ja 100 g/24 Stunden überschritt. In manchen Fällen war auch die Adrenalin-Ausscheidung erhöht. Die erhöhte Noradrenalin-Produktion mag durch den Abfall des Blutdruckes reflektorisch ausgelöst werden. Die erhöhte Noradrenalin-Ausscheidung wird wohl durch eine Hypersekretion an den vasomotorischen Nervenendigungen bedingt sein.

8. Thalliumvergiftung.

TILLMANN (1952) (136) konnte bei einer Thalliumvergiftung mehr als 200 μ g Noradrenalin und 40 μ g Adrenalin in 24 Stunden beobachten.

v.EULER (129) hat 1952 die unter 2. bis 8. gemachten Beobachtungen in einer Tabelle zusammengefasst. Die Tabelle sei wegen ihrer Übersichtlichkeit hier wiedergegeben (Tabelle 14).

9. Spezifisch-dynamische Wirkung des Eiweisses.

Eine interessante Beobachtung gelang 1954 ABELIN/GOLDSTEIN (137). In Versuchen am Menschen wurde die Urinausscheidung von Adrenalin, Noradrenalin und Oxytyramin vor und nach Fleischzufuhr verfolgt. Nach Aufnahme von 200-300 g Fleisch nimmt die Katechinamin-Ausscheidung während etwa 6 Stunden stark zu und von da an allmählich ab, um normale bis unternormale Werte zu erreichen. Dieser Verlauf erinnert an den Gang der spezifisch-dynamischen Wirkung des Eiweisses, wie er sich im kalorischen Haushalt und in der Ausscheidung des Harnstoffes kundtut. Am stärksten ist das Anwachsen des Noradrenalin- und Oxytyramingehaltes des Harns; die Zunahme der Adrenalin-Ausscheidung ist ebenfalls deutlich. Es wird daher angenommen, dass am Zustandekommen der spezifisch-dynamischen Wirkung der Eiweisskörper die Hormone des Nebennierenmarks sowie das Nervensystem, speziell der Sympathicus mitbeteiligt sind. (Der Urin wurde der Säurehydrolyse unterworfen, die Katechinamine an Aluminiumoxyd adsorbiert und mit der Äthylendiamin-Methode nach WEIL-MALHERBE/BONE (104) bestimmt.)

10. Stress-Zustände.

Bei Zuständen, die mit Stress verbunden sind, ist die Adrenalin-Ausscheidung im Urin selektiv erhöht. Dies ist zum Beispiel der Fall bei Infektionskrankheiten, operativen Eingriffen und Pneumo-Encephalographie. Auch bei Fliegern findet man oft während des Fliegens eine bedeutend erhöhte Adrenalin-Ausscheidung als Anzeichen einer psychischen Belastung (v.EULER/LUNDBERG, 1954) (138).

TABELLE 14

Adrenalin- und Noradrenalin-Ausscheidung im Urin unter verschiedenen Bedingungen (v. EULER, 129)

	Adrenalin		Noradrenalin		Adrenalin- %gehalt
	g/min	g/24 Std.	g/min	g/24 Std.	
Normal	0,003-0,007	4-8	0,015-0,06	20-40	10-20
Schwere körperliche Arbeit	0,02 -0,10	-	0,20 -0,50	-	10-20
Adrenalektomie	-	1(-4)	-	20-40	0(-10)
Phaeochromocytom	0,01 - 0,4	15-600	0,15 - 2,0	200-3000	1-60
Insulin-Hypoglykaemie	0,055+0,007	-	0,026+0,004	-	68
ACTH-Behandlung	0,005-0,01	7-15	0-0,02	0-20	50-100
Coronarthrombose	0,005-0,02	7-30	0,05 -0,15	70-200	10-20
Essent. Hochdruck	-	5-10	-	20-200	5-20
Thallium-Vergiftung	0,03	46	0,16	234	16

11. Myocardinfarkt.

BISCHOFF/NUZUM (117) fanden bei 3 Fällen von Myocardinfarkt eine deutlich erhöhte Adrenalin-Ausscheidung im Urin. Die Ursache hierfür war ihnen nicht bekannt.

12. Posturale Hypotonie.

Endlich mag erwähnt werden, dass bei dem seltenen Zustand der posturalen Hypotonie die Katechinamin-Ausscheidung im Urin sehr klein ist. Durch Insulinhypoglykämie lässt sich hier kein Adrenalin freisetzen, was darauf hindeutet, dass die Katechinamin-Produktion bei dieser Krankheit beeinträchtigt ist. Auch die Vasomotoren vermögen wohl nicht das notwendige Noradrenalin hervorzubringen (v.EULER, 1954) (6).

D. Katechinamin-Ausscheidung im Urin bei Phaeochromozytomen

Phaeochromozytome sind in letzter Zeit häufiger diagnostiziert worden. Da noch keine diagnostische Methode bekannt ist, die mit Sicherheit ein Phaeochromozytom nachzuweisen oder auszuschliessen erlaubt, ist es wohl angebracht, die Katechinamin-Ausscheidung im Urin bei Phaeochromozytomen in einem besonderen Kapitel zu behandeln. Zunächst seien die bisher zum Phaeochromozytom-Nachweis geübten Methoden geschildert.

I. Diagnostische Methoden zum Phaeochromozytom-Nachweis

1. Methoden zur Anfallsauslösung

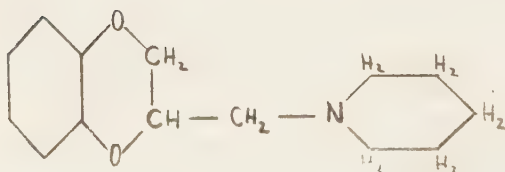
- a) Durch Palpation und Lagerung kann man manchmal auf den Tumor einen Druck ausüben, was zur Ausschüttung der Katechinamine aus dem Tumor und somit zur Auslösung eines Paroxysmus (einer Blutdruckkrise) führt.

- b) **Cold pressure-Test:** Das Eintauchen eines Armes in Eiswasser vermag gelegentlich eine Blutdruckkrise hervorzurufen, jedenfalls einen Blutdruckanstieg um 15-20 mm Hg auszulösen, der sowohl den systolischen als auch den diastolischen Blutdruck betrifft. Bei Phaeochromozytomen ist dieser Test meist positiv. Da jedoch unter gleichen Bedingungen ein Blutdruckanstieg auch bei anderen Hochdruckkrankheiten zu beobachten ist, verliert der Test an Zuverlässigkeit.
- c) **Histamin-Test:** Zuerst wollte man, da Adrenalin und Histamin eine antagonistische Wirkung haben, Histamin zur Senkung des hohen Blutdrucks bei Phaeochromozytompatienten verwenden. ROTH/KVALE (1945) (139) stellten jedoch fest, dass kleine intravenöse Histamingaben (0,05 mg) bei Phaeochromozytomkranken eine starke Erhöhung des systolischen und diastolischen Blutdrucks auslösen (bis zu 100 mm Hg und mehr). Wahrscheinlich verursacht Histamin eine Ausschüttung der Katechinamine aus dem Tumorgewebe und provoziert so die beobachtete deutliche Blutdruckerhöhung. Man verwendet daher heute den Histamin-Test zum Nachweis von Phaeochromozytomen. Nach Entfernung der Tumoren geben die gleichen Patienten wie normale Gesunde eine negative Antwort auf den Histamin-Test, d.h. einen Blutdruckabfall. ROTH/KVALE fanden unter 4 Phaeochromocytomfällen 1 falsche negative Antwort. EVANS et al. (140) berichten von falschen positiven und falschen negativen Ergebnissen mit dem Histamin-Test.

Alle Teste, die eine Blutdruckkrise provozieren, bedeuten eine ernste Gefahr für den Patienten, besonders wenn der Anfangswert des Blutdrucks bereits hoch liegt. Man muss daher von diesen Testen abraten.

2. Methoden zur Blockierung der Anfälle

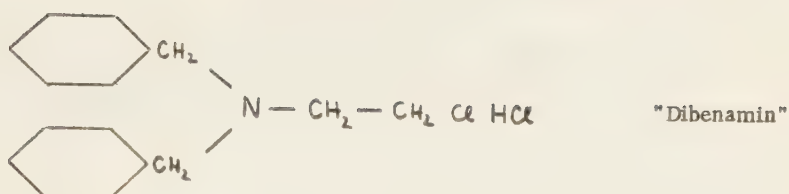
- a) Benzodioxan-Test: Man hat versucht, mittels 2-Piperidinmethyl-1,4-benzodioxan (F 933) eine erhöhte Katechinaminabgabe nachzuweisen, da dieser Stoff durch seine adrenolytische Wirkung stark blutdrucksenkend wirkt (GOLDENBERG et al.) (141, 142).
Nach intravenösen Injektionen von Benzodioxan (0,25 mg/kg Körpergewicht) erhält man bei Phaeochromocytomen einen deutlichen Blutdruckabfall. Die Probe ist auch bei Tumoren, die hauptsächlich Noradrenalin produzieren, positiv. Unangenehme Nebenwirkungen - Blutandrang zum Kopfe, starke Kopfschmerzen, Schwindel, Beklemmungsgefühl, substernale und abdominelle Schmerzen - zwingen manchmal zum Abbruch der Injektion.



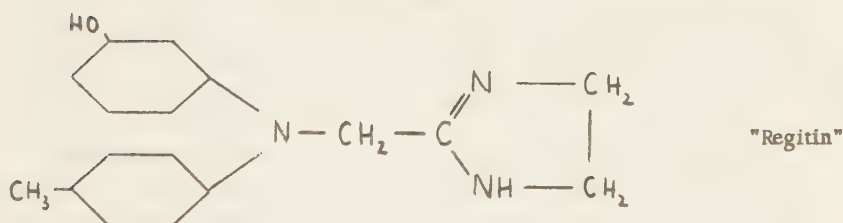
"Benzodioxan"

HAMILTON et al. (9) berichten bei 3 Phaeochromozytomen 1 richtigen positiven und 2 falsche negative Benzodioxan-Teste. GOLDENBERG/ARANOW (143) vermuten, dass das negative Resultat in sicheren Phaeochromozytom-Fällen auf einen übergelagerten essentiellen Hochdruck zurückzuführen sei. Weitere falsche negative Ergebnisse werden von TULLOH (144) und falsche positive Ergebnisse bei urämischer Hypertension von EMLETT et al. (145) mitgeteilt.

- b) Dibenamin-Test: N,N-Dibenzyl-β-chloräthylamin-hydrochlorid wirkt länger blutdrucksenkend und hat weniger Nebenwirkungen als Benzodioxan. Im Prinzip sind Benzodioxan- und Dibenamin-Test gleich.



- c) Regitin-Test: Keine Nebenwirkungen werden bei Verwendung von Regitin = 2 [N-p-Tolyl-N-m-oxyphenyl-aminomethyl] Imidazolin beobachtet.



Zur Ausführung des Tests werden 5 mg Regitin i.v. injiziert, bei Kindern 0,08 mg/kg Körpergewicht. Der erzielte Blutdruckabfall ~ 35-100 mm Hg und mehr ist deutlicher und hält länger an als beim Benzodioxan-Test. Zuverlässigkeit 85 %. Relativ häufig gegebenen Hypertonie-Fälle falsche positive Ergebnisse.

Die besten Ergebnisse lassen sich mit dem Regitin-Test erreichen. In gleicher Weise wie der Benzodioxan- und der Dibenamin-Test ist auch der Regitin-Test nicht immer zuverlässig. Die Tests sind nicht so spezifisch, wie anfangs angenommen wurde. Sie geben wohl wertvolle Hinweise in der Phaeochromozytom-Diagnostik, man kann sich jedoch nicht mit Sicherheit auf sie verlassen.

3. Röntgenologischer Nachweis der Tumoren

Der röntgenologische Nachweis der Tumoren ist sehr wertvoll, wenn er gelingt. Auch eine zusätzliche retroperitoneale Luftfüllung oder Aortographie führt nicht immer zum Erfolg.

II. Bestimmung der Katechinamin-Ausscheidung im Urin bei Phaeochromozytomen

Da der Nachweis von Phaeochromozytomen mit den oben geschilderten Methoden nicht immer gelingt, wird die Diagnose manchmal erst bei der Probelaparotomie verifiziert oder verworfen. 1950 gingen ENGEL/v.EULER (146) von folgender Überlegung aus: Wenn ein Patient an einem Phaeochromozytom leidet, dann müsste sich die erhöhte Katechinamin-ausschüttung aus dem Tumor in das Blut auch in einer erhöhten Katechinamin-Ausscheidung im Urin anzeigen. Sie untersuchten daher den Urin zweier phaeochromozytomverdächtiger Patienten auf seinen Katechinamingehalt. Aufbereitung des Urins nach v.EULER/HELLNER (7), biologische Bestimmung nach v.EULER (7,8). v.EULER (8) fasste die 2 Phaeochromozytom-Fälle von ENGEL/v.EULER mit weiteren 4 Phaeochromozytom-Fällen in einer Tabelle zusammen. Tabelle 15 zeigt die 24-Stunden-Ausscheidung von Adrenalin und Noradrenalin dieser 6 Phaeochromozytom-Fälle vor und nach der Operation und den Katechinamingehalt der Tumoren.

Als Ergebnisse wurden von v.EULER (8) aus Tabelle 15 abgeleitet:

1. In Phaeochromozytom-Fällen beträgt die Katechinamin-Ausscheidung im Urin das 10-50-fache des Normalen (normal etwa 10 μ g Adrenalin/24 Stunden und 30 μ g Noradrenalin/24 Stunden).
2. Nach der Operation der Phaeochromozytome sinken diese hohen Katechinamin-Werte auf die Norm ab.
3. Das Verhältnis Adrenalin : Noradrenalin im Urin entspricht dem gleichen Verhältnis in den Tumoren.

TABELLE 15 (v. EULER, 8)

Pat.	24 Stunden-Ausscheidung im Urin						Tumor			
	Adren. in μ		Noradr. in μ		Adr. %		Adr. mg/g	Noradr. mg/g	% Adr.	Gewicht in g
	vor Operation	nach Operation	vor Operation	nach Operation	vor Operation	nach Operation				
1	13		545		2,3					
	54	2,2	1240	27	4,2	8	0,05	4,5	1	48
	21		970		2,1					
2	250		113		69					
	190	11	253	37	43	22	0,75	0,75	50	20
	780		660		54					
3	59		138		30					
	63		153		29		2,11	1,54	58	200
	103		125		45					
4	164		181		48					
	224	3,4	384	20	37	15	2,3	7,4	24	147
5	138		875		14					
	28	9	234	81	11	10	0,15	1,27	11	6
6	24		1790		1,3					
	18	5	1800		1,0	7	0,05	8,4	1	50

Der Katechinamingehalt der Tumoren wurde biologisch (7,8) und kolorimetrisch (33,34) bestimmt. Kolorimetrische und biologische Werte stimmten gut miteinander überein.

HOLTON (147) und GOLDENBERG/APGAR/DETERLING/PINES (148) zeigten, dass Paeochromocyto me fast nur Noradrenalin enthalten können. Dies wurde hier in 3 Fällen beobachtet. In den anderen 3 Fällen jedoch war der Adrenalingehalt beträchtlich. Es ist beachtenswert: In den 3 Fällen, die fast nur Noradrenalin im Urin ausschieden, lag der Tumor ausserhalb der Nebenniere (in der Bifurkation der Aorta abdominalis oder im Winkel zwischen A. renalis und Aorta abdominalis). Dagegen war in den anderen 3 Fällen der Tumor fest anatomisch mit der Nebenniere verbunden. Daher könnte eine fast ausschliessliche Ausscheidung von Noradrenalin darauf hindeuten, dass der Tumor ausserhalb der Nebenniere liegt (Operation I!).

In Fall 6 konnten mit Hilfe der Papierchromatographie grosse Mengen von Oxytyramin im Urin nachgewiesen werden. Normal werden 100-200 μ

Oxytyramin/24 Stunden im Urin ausgeschieden. Fall 6 schied jedoch innerhalb 24 Stunden etwa 2000 μ g Oxytyramin aus. Dieser hohe Wert lässt die Vermutung zu, dass Noradrenalin (hier 1800 μ g/24 Stunden ausgeschieden) über die Stufe des Oxytyramins im Tumorgewebe gebildet wird. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Decarboxylierung des Dopa zu Oxytyramin.

LUND wandte seine Methode (97) auch zur Untersuchung des Urins an. Der Urin wurde mit Natriumcarbonat auf pH 8,5 gebracht. Er wurde genau so analysiert wie Blutserum, nur dass kein 0,2 n Natriumacetat zugegeben wird. LUND (113) fand, dass Patienten mit Phaeochromocytom die 10-100 fache Menge der Katechinamine gegenüber dem Normalen ausscheiden (Tabelle 16).

Tabelle 16: Adrenalin (A) und Noradrenalin (N) im Urin von Patienten mit Phaeochromocytom (LUND, 113).

Fall	Konzentration	24 Std. - Urinmenge in ccm	Katechinamin- Ausscheidung in 24 Stunden
4	60 μ g % A + 15 μ g % N	700	420 μ g N + 105 μ g A
5	250 μ g % N		
6	20 μ g % N während des Anfalls 1 μ g % N nach dem Anfall		
	72 μ g % N + 21 μ g % A	3400	2450 μ g N + 700 μ g A
7	80 μ g % N + 26 μ g % A	3030	2430 μ g N + 790 μ g A
	85 μ g % N + 21 μ g % A	3600	3060 μ g N + 740 μ g A
Normal nach LUND (97)	4 (1-9) μ g % N		50 (30-85) μ g N

Die Werte von Patient 7 wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Patient 7 starb 4 Tage nach der Operation, nachdem ein ungewöhnlich grosser Tumor entfernt worden war.

LUND urteilt schliesslich: Werden im Urin mehr als 10 $\mu\%$ Katechinamine ausgeschieden, dann ist dies pathologisch. Werden mehr als 100 μN (+ A) / 24 Stunden im Urin ausgeschieden, dann deutet dies auf ein Phaeochromocytom.

HAMILTON/LITCHFIELD/PEART/SOWRY (9) untersuchten 1953 den Urin von Patienten mit essentiellm Hochdruck und phaeochromocytomverdächtiger Patienten. Der Urin wurde nicht hydrolysiert, nur die freien Katechinamine wurden bestimmt. Aufbereitung des Urins nach v.EULER/HELLNER (7), biologische Bestimmung nach HAMILTON/LITCHFIELD/PEART/SOWRY (9). 28 Patienten mit essentiellm Hochdruck wurden untersucht, als höchste Ausscheidung ergaben sich 70 μ Adrenalin und Noradrenalin/24 Stunden. Die Werte der 5 phaeochromocytomverdächtigen Patienten seien in Tabelle 17 angeführt.

Tabelle 17: Katechinamin-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin in μ
(HAMILTON et al., 9)

Fall	Vor Operation		Nach Operation
	Katechinamine (A+N)	Verhältnis N:A	Katechinamine (A+N)
3	4375	3,0	40
4	500	4,0	70
5	412	1,5	45
F	1082	9,0	25
G	600 ⁺	0,5	-

+ = Urin nur von 14 Stunden.

Die Diagnose Phaeochromocytom wurde aus der hohen Katechinamin-Ausscheidung im Urin gestellt und durch die Operation verifiziert. In den geschilderten Phaeochromocytom-Fällen ist der kleinste Wert (412 μ) mindestens 5 mal so gross wie der höchste Wert des essentiellen Hochdrucks (70 μ).

Das Verhältnis Noradrenalin : Adrenalin im Urin und in den Tumoren warc parallel, wie dies ENGEL/v.EULER (146) berichten. Keiner der Tumoren lag jedoch ausserhalb der Nebenniere, obwohl der Noradrenalin-

gehalt in 2 Fällen (4 und F) sehr hoch war. Das widerlegt die Ansicht v.EULERS (8), dass ein hoher Noradrenaliningehalt im Urin auf einen Tumor hinweise, der ausserhalb der Nebennieren liege. Der Nachweis der erhöhten Katechinaminausscheidung im Urin ist die zuverlässigste Methode, ein Phaeochromocytom zu diagnostizieren. Bisher wurde noch kein falsches positives Ergebnis damit erzielt. Sicher ist es noch zu früh, um zu behaupten, es sei noch kein falsches negatives Ergebnis vorgekommen.

LUND/v.EULER/OLSSON/SANDBLOM (149) wiesen 1953 mit der erhöhten Katechinaminausscheidung im Urin ein Phaeochromocytom nach. Bei dem Patienten fielen alle übrigen diagnostischen Proben negativ aus, sein Leiden wurde als essentieller Hochdruck angesehen und eine Sympathektomie erwogen. Erst die Untersuchung des Urins führte zur richtigen Diagnosestellung. Urinaufbereitung nach v.EULER/HELLNER (7). Biologische Bestimmung nach v.EULER (7,8). Die Werte zeigt Tabelle 18.

Tabelle 18: Adrenalin- und Noradrenalinausscheidung im Urin bei einem Phaeochromocytom (nach LUND et al., 149)

Datum	Adrenalin µ/24 Std.	Noradrenalin µ/24 Std.	Adrenalin- % Gehalt	
26.2.52	19	1200	1,6	vor Operation
8.3.52	16	1010	1,6	vor Operation
20.4.52	1,5	34	4,0	nach Operation

Der Noradrenaliningehalt des venösen Blutes betrug in diesem Fall (nach LUND (97) bestimmt) vor der Operation 3,6 µ% (= 36 µ/1), nach der Operation weniger als 0,2 µ% (= 2 µ/1).

Teile des entfernten Phaeochromocytoms wurden im Labor von LUND fluorimetrisch und im Labor von v.EULER biologisch und kolorimetrisch bestimmt. Die Werte können Tabelle 19 entnommen werden.

Tabelle 19: Adrenalin und Noradrenalin im Tumorgewebe
(LUND et al., 149)

Methode	γ Adrenalin/ g Tumor	γ Noradrenalin/ g Tumor	Adrenalin- % Gehalt
biol. (v.EULER, 8)	12	590	2
kolor. (v.EULER, 33, 34)	70	630	10
fluor. (LUND 97)	97	800	11

Die verschiedenen Werte bei kolorimetrischer und fluorimetrischer Bestimmung mag man einer unregelmässigen Verteilung der Katechinamine im Tumor zuschreiben. Der geringe Adrenalinwert bei der biologischen Bestimmung könnte mit der geringen Adrenalinausscheidung im Urin zusammenhängen. Es muss jedoch -wie LUND/v.EULER/OLSSON/SANDBLOM (149) meinen- auch an die Möglichkeit gedacht werden, dass andere Katechinamine den hohen Adrenaliningehalt bei der kolorimetrischen und fluorimetrischen Bestimmung vorgetäuscht haben, indem sie Adrenalin nachahmten.

1954 teilten GOLDENBERG/SERLIN/EDWARDS/RAPPORT (118) die Katechinamin-Ausscheidung von 16 Phaeochromocytom-Fällen mit. Die Werte wurden biologisch am Katzenblutdruck bestimmt und sind in Noradrenalin-Äquivalenten angegeben (Tabelle 20).

Tabelle 20: Katechinamin-Ausscheidung im Urin bei 16 Phaeochromocytom-Fällen (nach GOLDENBERG et al., 118)

Pat.	24 Stunden-Urin in ccm	µNoradrenalin-Äquivalente/24 Stunden
1	2850	1020 = 2040 Adr.
2	680	1700
3	1080	2700
4	1810	760
5	1200	600
6	1230	1845
7	920	1380 Noradr. + 920 Adr.
8	1575	870
9	4250	1530
10	2490	1120
11	1080	290
12	545	55 = 110 Adr.
13	900	900 Noradr. + 900 Adr.
14	1680	590
15	940	190
16	1350	675

Zur gleichen Zeit wurde von GOLDENBERG/SERLIN/EDWARDS/RAPPORT (118) die Katechinamin-Ausscheidung von 35 Patienten mit essentiellem Hochdruck biologisch bestimmt. Die Werte schwankten zwischen 7 und 100 µNoradrenalin-Äquivalente/24 Stunden. Infolge der stark erhöhten Katechinamin-Ausscheidung im Urin ist eine Abgrenzung der Phaeochromocytom-Fälle von den Fällen mit essentiellem Hochdruck möglich.

ISRAELSKI/KENDALL/SHAW (150) berichten 1954 ein Phaeochromocytom bei einem 10-jährigen Kind, dessen Noradrenalin-Ausscheidung im Urin auf 2000 µ/24 Stunden gestiegen war (normal für Kind 20 µ/24 Stunden). Urinaufbereitung nach v.EULER/HELLNER (7), biologische Bestimmung nach v.EULER (7,8).

1955 konnten PEKKARINEN/PITKÄNEN (123) ein Phaeochromocytom mit einer Ausscheidung von 1354 µ Noradrenalin/24 Stunden nachweisen. Adrenalin wurde von diesem Phaeochromocytom nicht ausgeschieden.

Zusammenfassender Überblick

Zur Bestimmung des Adrenalin- und Noradrenalingehaltes des Urins muss man die Katechinamine aus dem Urin isolieren. Die Katechinamine werden teils in freier Form und teils -als Estersulfate (RICHTER; BEYER/SHAPIRO; S. 99) und Glukuronide (CLARK et al. S. 99) - in gebundener Form im Urin ausgeschieden (vgl. Tab. 21). Durch Säurehydrolyse des Urins werden die gebundenen Katechinamine in Freiheit gesetzt. Die freien Katechinamine werden im nicht-hydrolysierten, die Gesamtkatechinamine im hydrolysierten Urin bestimmt. Aus der Differenz dieser beiden Werte ergibt sich der Wert für die gebundenen Katechinamine. Die Katechinamine werden an Aluminiumhydroxyd oder besser an Aluminiumoxyd adsorbiert und aus ersterem mit Aceton-Alkohol (v. EULER/HELLNER S. 94; GOLDENBERG et al. S. 96) aus letzterem mit Schwefelsäure (v. EULER/ORWÉN; S. 97) oder mit Oxalsäure (PEKKARINEN; S. 99) eluiert. Dann werden die Katechinamine in den konzentrierten Eluaten bestimmt. Bei der Aufbereitung des Urins gehen etwa 20-25 % der Katechinamine durch Oxydation verloren.

HOLTZ/CREDNER/KRONEBERG (S. 99) konnten als erste die Katechinamine im normalen menschlichen Urin nachweisen und sprachen auf Grund biologischer Analyse die Vermutung aus, dass das von ihnen gefundene "Urosympathin" aus Adrenalin, Noradrenalin und Oxytyramin bestünde. Diese Annahme konnten v. EULER/HELLNER (S. 99) bestätigen. Über die normale Katechinamin-Ausscheidung im Urin gibt Tabelle 21 Auskunft. Die Adrenalinwerte von v. EULER/HELLNER (S. 100) und von v. EULER/HELLNER-BJÖRKMAN ORWÉN (S. 101) stimmen gut überein. Für Noradrenalin teilen letztere den doppelten Wert mit, der von ersteren genannt wird. Die Katechinaminwerte von Pekkarinen/Pitkänen (S. 101) liegen etwas höher, da sie in Noradrenalin-Äquivalenten angegeben werden. Während die bisher genannten Autoren ihre Werte in $\mu\text{g}/24 \text{ Std.}$ berichten, wählte WEIL-MALHERBE (S. 101/102) als Dimension $\mu\text{g}/1 \text{ Urin}$. Nimmt man jedoch eine durchschnittliche normale Ausscheidung von 1,5 μg 1 Urin/24 Std. an, dann kommen seine Werte den Werten der übrigen Autoren sehr nahe. Als Durchschnittswerte für normalen menschlichen Urin lassen sich nennen: Adrenalin 10 $\mu\text{g}/24 \text{ Std.}$, Noradrenalin 30-60 $\mu\text{g}/24 \text{ Std.}$, Oxytyramin 0,1-0,2 $\text{mg}/24 \text{ Std.}$. Wegen der geringen biologischen Aktivität des Oxytyramins wird der Oxytyraminwert meist vernachlässigt (S. 100).

Tabelle 21: Normale Katechinamin-Ausscheidung im menschlichen Urin

Verfasser	Bestimmung	Adrenalin		Noradrenalin		Oxytyramin	
		frei	gesamt	frei	gesamt	frei	gesamt
V. EULER/HELLNER (S. 99)	biol.	-	10 μ /24 Std.	-	30 μ /24 Std.	-	-
V. EULER/HAMBERG (S. 99)	biol. papierchroma- tographisch	-	-	-	-	-	0,1-0,2 mg/24 Std
V. EULER/HELLNER BJÖRKMAN/ORWEN (S. 100)	biol.	4,3 μ /24 Std.	9,5 μ /24 Std.	27 μ /24 Std.	60,5 μ /24 Std.	-	-
WEIL-MALHERBE (S. 102)	fluor.	-	11,2 μ /1 Urin	-	24,8 μ /1 Urin	-	82,3 μ /1 Urin
PEKKARINEN/ PITKÄNEN(S. 100)	fluor.	Gesamt-Katechinamine: 81 Noradrenalin-Äquivalente/24 Stunden					

Die Katechinamin-Ausscheidung ist in den Nachtstunden deutlich vermindert (v.EULER et al.S.101). Bei Muskelarbeit steigt sowohl die Adrenalin- wie die Noradrenalinausscheidung (v.EULER/HELLNER; S. 103). Insulinhypoglykämie führt zu einer erhöhten Adrenalin-Ausscheidung im Urin (v.EULER; S.103). In der Mehrzahl der Fälle mit essentiellem Hochdruck hält sich die Noradrenalin-Ausscheidung im Urin in normalen Grenzen (GOLDENBERG; BURN; v.EULER et al.S.104); in etwa 1/6 der Fälle konnten v.EULER et al. eine erhöhte Noradrenalin-Ausscheidung im Urin nachweisen (S.104). Sie werfen daher die Frage auf, ob die Ursache für diesen Teil der essentiellen Hochdruckfälle nicht eine erhöhte Noradrenalinbildung sein könnte. Nach Adrenalektomie fällt der Adrenalinwert im Urin auf Null ab, während sich der Noradrenalinwert kaum ändert (HELLSTRÖM et al.S.105). ACTH- und Cortisonbehandlung auf längere Zeit bringen ein Fallen der Noradrenalin-Ausscheidung mit sich (LUFT,v.EULER; S.105). In Fällen akuter Coronarthrombose steigt die Noradrenalin-Ausscheidung im Urin oft stark an (FORSSMAN et al.S.105). TILLMANN (S.106) konnte bei einer Thalliumvergiftung eine erhöhte Katechinamin-Ausscheidung im Urin beobachten. Nach Fleischezufuhr nimmt die Katechinamin-Ausscheidung während etwa 6 Std. stark zu und von da an allmählich wieder ab. Dieser Verlauf erinnert an den Gang der spezifisch-dynamischen Wirkung des Eiweisses (ABELIN/GOLDSTEIN; S.106). Bei Stress-Zuständen ist die Adrenalin-Ausscheidung selektiv erhöht (v.EULER/LUNDBERG; S.106). BISCHOFF/NUZUM (S.108) fanden bei drei Fällen von Myokardinfarkt eine gesteigerte Adrenalin-Ausscheidung im Urin. Bei dem seltenen Zustand der posturalen Hypotonie ist die Katechinamin-Ausscheidung im Urin sehr klein (v.EULER S.108).

Der Nachweis von Phaeochromozytomen ist schwierig, weil die bisher geübten diagnostischen Methoden - Druck auf den Tumor, Cold pressure Test, Histamin-Test; Benzodioxan-Test, Dibenamin-Test, Regitin-Test; röntgenologischer Nachweis der Tumoren - nicht mit Sicherheit die Diagnose eines Phaeochromozytoms erlauben. Dazu sind die Tests, die einen Paroxysmus auslösen sollen (Druck auf den Tumor, Cold pressure Test, Histamin-Test), für den Patienten gefährlich. Von den Tests, die die Anfälle blockieren sollen (Benzodioxan-Test, Dibenamin-Test, Regitin-Test), haben die beiden ersten unangenehme Nebenwirkungen. Da

Phaeochromozytome als Nebennierenmarkstumoren Adrenalin und Noradrenalin produzieren und die Katechinamine während der Paroxysmen und in den Intervallen an das Blut abgeben, lag eine Überprüfung der Katechinamin-Ausscheidung in Urin bei Phaeochromozytomen nahe. Als erste konnten ENGEL/v.EULER (S.112) aus der erhöhten Katechinamin-Ausscheidung im Urin 2 Phaeochromozytome nachweisen. Normal werden im Urin 10 μ g Adrenalin/24 Stunden und 30-60 μ g Noradrenalin/24 Stunden ausgeschieden. Bei Phaeochromozytomen berichtet v.EULER (S.112) eine 10-50-fache und LUND (S.114) eine 10-100-fache Menge der normalen Katechinamin-Ausscheidung im Urin. Eine Abgrenzung gegenüber essentiellen Hochdruckfällen ist möglich, da diese weit weniger Katechinamine ausscheiden (HAMILTON et al. S.115; GOLDENBERG et al. S.118; v.EULER et al. S.104). Häufig wird bei Phaeochromozytomen mehr Noradrenalin als Adrenalin ausgeschieden, aber auch der umgekehrte Fall wurde schon wiederholt beobachtet. Die Ansicht v.EULERS (S.113), dass Tumoren die hauptsächlich Noradrenalin ausscheiden, außerhalb der Nebenniere lägen, konnte von HAMILTON et al. (S.115) widerlegt werden. Manchmal versagen alle übrigen diagnostischen Methoden und nur der Nachweis einer erhöhten Katechinamin-Ausscheidung im Urin erlaubt die Diagnose Phaeochromozytom. Der hohe diagnostische Wert dieser Methode wurde schon von ENGEL/v.EULER herausgestellt und von den übrigen Autoren bestätigt. Die bisher erzielten Ergebnisse bringt Tabelle 22. In allen Fällen wurde die Diagnose Phaeochromozytom durch die Operation verifiziert. Nach der Operation sinken die hohen Katechinaminwerte auf die Norm ab (v.EULER; S.112). Der Nachweis der erhöhten Katechinamin-Ausscheidung im Urin ist zur Zeit die zuverlässigste Methode, ein Phaeochromozytom zu diagnostizieren (HAMILTON et al. S.116). Bisher wurde noch kein falsches positives Ergebnis damit erzielt. Falsche negative Ergebnisse sind ebenfalls noch nicht beobachtet worden.

Tabelle 22: Katechinamin-Ausscheidung im Urin bei
Phaeochromozytomen.

Verfasser	Zahl d. Fälle	Bestimmung	Adrenalin μ/24 Std.	Noradrenalin μ/24 Std.
ENGEL/v.EULER und v.EULER (S.113)	6	biol.	13- 250	113-1800
LUND (S.114)	4	fluor.	105- 790	420-3060
LUND et al. (S.116)	1	biol.	19	1200
GOLDENBERG et al. (S.118)	16	biol.	110-2040	190-2700
ISRAELSKI et al. (S.118)	1	biol.	-	2000
PEKKARINEN/ PITKÄNEN (S.118)	1	fluor.	-	1854
HAMILTON et al. (S.115)	5	biol.	412-4375 A + N	
Normale Katechinamin-Ausscheidung im menschlichen Urin			10	30-60

ZUSAMMENFASSUNG

In der Einleitung werden Entdeckung, chemische und physikalische Eigenschaften, Entstehung und Abbau sowie die Physiologie von Adrenalin und Noradrenalin kurz geschildert.

Die Katechinamine kann man biologisch, kolorimetrisch, papierchromatographisch und fluorimetrisch bestimmen. In Lösung lassen sich Adrenalin und Noradrenalin relativ leicht nachweisen. Die Bestimmung des Katechinamingehaltes von Blut und Urin ist schwieriger, da man die Katechinamine erst aus Blut und Urin isolieren muss. Dies erfolgt durch Adsorption von Adrenalin und Noradrenalin an Aluminiumoxyd. Aus diesem werden Adrenalin und Noradrenalin mit Säure eluiert. Bei der Adsorption an Aluminiumoxyd gehen 20-25 % der Katechinamine durch Oxydation verloren. Dann wird der Katechinamingehalt der konzentrierten Eluate bestimmt und die erhaltenen Werte werden auf das Ausgangsmaterial umgerechnet. Die biologischen Bestimmungsmethoden werden hauptsächlich in Physiologie und Pharmakologie geübt. Kolorimetrisch lassen sich 0,5 μ g Adrenalin bzw. Noradrenalin / ccm nachweisen. Papierchromatographisch lassen sich 0,02 μ g Adrenalin bzw. Noradrenalin erfassen. Als geringste nachweisbare Menge werden für die fluorimetrische Bestimmung 0,001 μ g Adrenalin bzw. Noradrenalin / ccm genannt.

Der genaue Katechinamingehalt des menschlichen Blutes ist noch nicht bekannt. Ein Teil der Autoren berichtet 3 μ g Adrenalin / ccm Plasma, ein anderer Teil 0,002 - 0,003 μ g Adrenalin / ccm Plasma und 0,004 - 0,005 μ g Noradrenalin / ccm Plasma. Die letzteren Werte erscheinen als die wahrscheinlicheren.

Im menschlichen Urin werden normal 10 μ g Adrenalin / 24 Std., 30-60 μ g Noradrenalin / 24 Std. und 0,1 - 0,2 mg Oxytyramin / 24 Std. ausgeschieden. Über die Katechinamin-Ausscheidung im Urin unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen liegt eine Vielzahl von Untersuchungen vor. Bei Phaeochromozytomen ist die Katechinamin-Ausscheidung im Urin gegenüber der Norm um das 10-100 fache erhöht. Der Nachweis einer derartig erhöhten Katechinamin-Ausscheidung im Urin ist zur Zeit die sicherste Methode, ein Phaeochromozytom zu diagnostizieren.

Literaturverzeichnis

1. v.Euler U.S.: Acta physiol.Scand.11, 168 (1946)
2. v.Euler U.S.: Acta physiol.Scand. 12, 73 (1946)
3. v.Euler U.S.: Acta physiol.Scand. 16, 63 (1948)
4. Bülbring, E. und Burn J.H.:
Brit.J.Pharmacol. 4, 202 (1949)
5. Peart W.S.: J.Physiol. 108, 491 (1949)
6. v.Euler U.S.: Triangel (Sandoz Nbg.) Bd.I/6 Mai 1954,
S.101
7. v.Euler U.S.und Hellner S.:
Acta physiol. Scand. 22, 161 (1951)
8. v.Euler U.S.: Ann.Surg. 134, 929 (1951)
9. Hamilton M., Litchfield J.W., Peart W.S. und Sowry G.S.:
Brit.Heart J. 15, 241 (1953)
10. Guggenheim M.: Die biogenen Amine
Karger-Verlag, Basel/New York 1951,S.580
11. Elliott: J.Physiol. 44, 374 (1912)
12. Tiffeneau: J.Pharmacie et Chim. 23, 313, 366 (1921)
13. Richaud: C.r.Soc.Biol. 86, 26 (1922)
14. Barger und Dale: J.Physiol. 41, 19 (1910)
15. Raymond-Hamet: C.r.Acad.Sci. 191, 869 (1930)
16. Tainter: Arch.int.Pharmacodyn.et Ther.41, 365(1931)
17. Schumann: Klin.Wschr. S.604 (1948)
18. Bacq und Fischer: Arch.int.Physiol. 55, 73 (1947)
19. Burn, Hutcheon u. Parker: Brit. J. Pharm. Chemother. 5, 142 (1950)
20. Trendelenburg: Arch.exp.Path.Pharm. 63, 161 (1910)
21. Trendelenburg: Z.f.Biol. 57, 90 (1911)
22. Trendelenburg: Münch.med.Wschr. S.1919 (1910)
23. Trendelenburg: Arch.exp.Path.Pharm. 79, 154 (1915)
24. O'Connor: Münch.med.Wschr. S.1439 (1911)
25. Gaddum, Peart und Vogt: J.Physiol.108, 467 (1947)
26. Gaddum und Lembeck: Brit.J.Pharm.Chemother. 4, 91 (1949)
27. Whitehorn J.C.: J.biol.Chem. 108, 633 (1935)
28. Shaw F.H.: Biochem.J. 32, 19 (1938)
29. James W.O.: Nature 161, 851 (1948)

30. Heinrich D.u.Schuler, W.:
Helv.chim.Acta 31, 320 (1948)
31. Schuler W., Heinrich D. und Lazarus E.:
Helv.Physiol.Pharmacol.Acta 7, C 22 (1949)
32. Heinrich D. u. Schuler, W.:
Helv.Physiol.Pharmacol.Acta 7, C 36 (1949)
33. v.Euler U.S und Hamberg U.:
Acta physiol.Scand. 19, 74 (1949)
34. v.Euler U.S. und Hamberg U.:
Science 110, 561 (1949)
35. Suzuki T. und Ozaki T.:
Tohoku J.Exp.Med. 54, 332 (1951)
36. James W.O. und Kilbey N.:
J.Pharm.Pharmacol. 3, 22 (1951)
37. Salgo E.:
Z.anal.Chemie 138, 101 (1953)
38. Vulpian A.:
C.r.Acad.Sci. 43, 663 (1856)
39. Krukenberg:
Virchows Archiv 101, 542 (1885)
40. Mühlmann:
Münch.med.Wschr. S.623 (1896)
41. Comessati G.:
Münch.med.Wschr. S.1926 (1908)
42. Comessati G.:
Arch.Farmacol.Spez. 8, 159 (1909)
43. Comessati G.:
Klin.Wschr. 46 Nr.8
44. Ewins A.J.:
J.Physiol. 40, 316, 323 (1910)
45. Ewins A.J.:
Z.anal.Chemie 55, 173 (1916)
46. Krauss L.:
Biochem.Zschr. 22, 131 (1911)
47. Krauss L.:
Z.anal.Chemie 50, 661 (1911)
48. Russmann A.:
Klin.Wschr. S.654 (1922)
49. Stuber B., Russmann A.und Pröbsting E.A.:
Z.exp.Med. 32, 448 (1923)
50. Viale G.:
C.r.Soc.Biol. 110, 564 (1932)
51. Grübler:
Pharm.Post.S.579 (1907)
52. Gunn A. und Harrison E.F.:
Pharmac.J. 24, 718 (1907)
53. Ekkert L.:
Pharm.Ztrh.S.209 (1934)
54. Boas K.:
Zbl.Physiol. 22, 825 (1908)
55. Boas K.:
Chem.Zbl. 80, I 1609 (1909)
56. Pellerin G.:
Bull.Sci.pharmacol. 33, 202 (1926)
57. Pellerin G.:
Chem.Zbl. 98, I 331 (1927)

58. Ekkert L.: Pharm.Ztrh. 71, 417 (1930)
59. Ekkert L.: Z.anal.Chemie 84, 157 (1931)
60. Reiss R.: Z.anal.Chemie 145, 265 (1955)
61. Schuler W., Heinrich D. und Buchs P.:
Helv.Physiol.Pharmacol.Acta 7, C 38 (1949)
62. Goldenberg M., Faber M., Alston E.F. und Chargaff E.C.:
Science 109, 534 (1949)
63. v.Euler U.S. und Hamberg U.:
Acta chem.Scand. 4, 1185 (1950)
64. v.Euler U.S. und Hamberg U.:
Biochem.J. 49, 655 (1951)
65. James W.O. und Kilbey N.: Nature 166, 67 (1950)
66. Glazko A.J. und Dill W.A.: Nature 168, 32 (1951)
67. Shea S.M.: Nature 165, 729 (1950)
68. Sheperd D.M. und West G.B.:
Nature 171, 1160 (1953)
69. Wankmüller:1 Apoth.Ztg. 5, 127 (1953)
70. Pitkänen M.E.: Scand.J.Clin.Lab.Invest. 6, 78 (1954)
71. Natelson S., Lugovoy J.K. und Pincus J.B.:
Arch.Biochem. 23, 157 (1949)
72. Hüter F.: Arzneimittel-Forsch. 2, 91 (1952)
73. Paget M.: Bull.Sci.pharmacol. 37, 537 (1930)
74. Loew O.: Biochem.Zschr. 85, 295 (1918)
75. Barker J.H., Eastland C.J. und Evers N.:
Biochem.J. 26, 2129 (1932)
76. Gaddum J.H. und Schild H.:
J.Physiol. 80, 9 (1934)
77. Tieg O.W.: Proc.Roy.Soc.London 116, 551 (1934)
78. Konzett H. u. Weiss, W.:
Arch.exp.Path.Pharm. 193, 440 (1939)
79. v.Hueber E.F.: Klin.Wschr. 19, 664 (1940)
80. Kalaja L. und Savolainen H.:
Nord.med.Tskr. 12, 3562 (1941)
81. Jørgensen K.S.: Acta Pharmacol.Toxicol. 1, 225 (1945)
82. Bloch W.: Helv.Physiol.Pharmacol.Acta 6, 122 (1948)
83. v.Porat B.V.: Acta med.Scand. 123, 317 (1946)

84. Lehmann G. und Michaelis H.F.:
Klin.Wschr. 20, 949 (1941)
85. Lehmann G. und Michaelis H.F.:
Arb.physiol. 12, 52 (1942)
86. Lehmann G. und Michaelis H.F.:
Arb.physiol. 12, 246 (1942)
87. Lehmann G. und Michaelis H.F.:
Arb.physiol. 14, 9 (1949)
88. Staub H. und Klingler M.:
Helv.Physiol.Pharmacol.Acta 3, 91 (1945)
89. Annersten A., Grönwall A. und Koiv E.:
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 1, 60 (1949)
90. West G.B.:
J.Physiol. 106, 418 (1947)
91. Lund A.:
Acta Pharmacol.Toxicol. 5, 75 (1949)
92. Lund A.:
Acta Pharmacol.Toxicol. 5, 121 (1949)
93. Lund A.:
Acta Pharmacol.Toxicol. 5, 231 (1949)
94. Ehrlen I.:
Farm.Revy 47, 321 (1948)
95. Fischer P.:
Bull.Soc.Chim,Belges 58, 205 (1949)
96. Fischer P.:
Bull.Soc.Chim,Belges 59, 72 (1950)
97. Lund A.:
Acta Pharmacol.Toxicol. 6, 137 (1950)
98. Brücke F., Kaindl F., Kobinger W., Kraupp O. und Mayer H.:
Arch.exp.Path.Pharmacol. 219, 169 (1953)
99. Heller J.H., Setlow R.B. und Mylon E.:
Science 112, 88 (1950)
100. Heller J.H., Setlow R.B. und Mylon E.:
Am.J.Physiol. 161, 268 (1950)
101. Heller J.H., Setlow R.B. und Mylon E.:
Am.J.Physiol. 166, 304 (1951)
102. Mylon E. und Roston S.:
Am.J.Physiol. 172, 601 (1953)
103. Weil-Malherbe H. und Bone A.D.:
Biochem.J. 51, 311 (1952)
104. Weil-Malherbe H. und Bone A.D.:
Lancet 264, 974 (1953)
105. Weil-Malherbe H. und Bone A.D.:
Biochem.J. 58, 132 (1954)

106. Manger W.H., Baldes E.J., Flock E.V., Berkson J., Bollman J.L.
und Jacobs M.: Proc.Staff.Meetings Mayo Clinic 28, 526
(1953)
107. v.Euler U.S. und Floding I.:
Acta physiol.Scand. 33, Suppl.118, 45(1955)
108. Annersten A.: Acta chir.Scand. 97, 551 (1949)
109. Bu-Lock J. und Harley-Mason J.:
J.Chem.Soc. S.712 (1951)
110. Annersten A., Grönwall A. und Koiv E.:
Nature 163, 136 (1949)
111. Weil-Malherbe H. und Bone A.D.:
Nature 174, 557 (1954)
112. Holzbauer M. und Vogt M.:
Brit.J.Pharmacol. 9, 249 (1954)
113. Lund A.: Scand.J.Clin.Lab.Invest.4, 263 (1952)
114. Richter D.: J.Physiol. 98, 361 (1940)
115. Beyer K.H. und Shapiro S.H.:
Am.J.Physiol. 144, 321 (1945)
116. Clark W.G., Akawie R.I., Poground R.S. und Geissmann T.A.:
Abstr.Commun.XVIII Int.Physiol.Congr.
Copenhagen (1950)
117. Bischoff F. und Nuzum F.R.:
Circulation 7, 96 (1953)
118. Goldenberg M., Serlin I., Edwards T. und Rapport M.M.:
Am.J.Med. 16, 310 (1954)
119. v.Euler U.S. und Orwen I.:
Acta physiol.Scand. 33, Suppl.118, 1
(1955)
120. Pekkarinen A.: Pharmacol.Rev. 6, 35 (1954)
121. Holtz P., Credner K. und Kronenberg G.:
Arch.exp.Path.Pharm.204, 228 (1947)
122. Kroneberg G. und Schümann H.J.:
Arch.exp.Path.Pharm. 209, 350 (1950)
123. Pekkarinen A. und Pitkänen M.:
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 7, 1 (1955)
124. v.Euler U.S., Hellner-Björkman S. und Orwen I.:
Acta physiol.Scand.33, Suppl.118, 10 (1955)

- 125 v.Euler Chr., v.Euler U.S. und Floding I.:
Acta physiol.Scand. 33, Suppl. 118, 32 (1955)
126. Weil-Malherbe H.: Biochem.J. 63, I 4 P (1956)
127. v.Euler U.S. und Luft R.:
Brit.J.Pharmacol. 6, 286 (1951)
128. v.Euler U.S. und Hellner S.:
Acta physiol.Scand. 26, 183 (1952)
129. v.Euler U.S.: Scand.J.Clin.Lab.Invest. 4, 254 (1952)
130. v.Euler U.S., Hellner S. und Purkhold A.:
Scand.J.Clin.Lab.Invest.6, 54 (1954)
131. Goldenberg M.: Am.J. Med. 10, 627 (1951)
132. Burn G.P.: Brit.Med.J. 28/3, 697 (1953)
133. Hellström J., v.Euler U.S., Frankson K. und Gemzell C.A.:
Nord.Med. 48, 1119 (1952)
134. Luft R. und v.Euler U.S.:
Metabolism 1, 179 (1952)
135. Forssmann O., Hanson G. und Jensen C.:
Acta med.Scand. 142, 441 (1952)
136. Tillmann S.: Svenska l äk.-tidn. 49, 1523 (1952)
137. Abelin I. und Goldstein M.:
Helv.Physiol.Pharmacol.Acta 12, C 59 (1954)
138. v.Euler U.S. und Lundberg V.:
J.Appl.Physiol. 6, 551 (1954)
139. Roth G.M. und Kvale W.F.:
A.J. Med.Sci. 210, 653 (1945)
140. Evans J., Rubitski H., Bartels C. und Bartels E.:
Am.J. Med. 11, 448 (1951)
141. Goldenberg M., Snyder C.H. und Aranow H.:
J.A.M.A. 135, 971 (1947)
142. Goldenberg M. und Aranow H.:
Fed.Proc. 9, 276 (1950)
143. Goldenberg M. und Aranow H.:
J .A.M.A. 143, 1139 (1950)
144. Tulloh H.P.: Brit.med.J. 1, 531 (1952)
145. Emlett J.R., Grimson K.S., Bell J.M. und Orgain E.S.:
J.A.M.A. 146, 1383 (1951)

146. Engel A. und v.Euler U.S.:
Lancet 259, 387 (1950)
147. Holton P.:
J.Physiol. 108, 525 (1949)
148. Goldenberg M., Apgar V., Deterling R. und Pines K.L.:
J.A.M.A. 140, 776 (1949)
149. Lund A., v.Euler U.S., Olsson A. und Sandblom Ph.:
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 5, 122 (1953)
150. Israelski M., Kendall A.C. und Shaw R.E.:
Arch.Disease of Childhood 29, 18 (1954)

Es ist mir eine angenehme Pflicht,
Herrn Prof. Dr. med. Dr. ing. Helmut NIEMER
für die Überlassung des Themas und sein stetes
Wohlwollen wärmstens zu danken.

Herrn Dekan Prof. Dr. med. Kurt Kolle
danke ich vielmals für die Annahme der Arbeit.

Lebenslauf

Ich wurde am 21.3.1933 als zweites Kind des praktischen Arztes Dr.med. Hugo Lermann und seiner Ehefrau Hilde, geb. Gabler, in Chemnitz geboren.

Von 1939 bis 1943 besuchte ich die Volksschule meiner Vaterstadt. Im September 1943 trat ich in das humanistische Gymnasium Chemnitz ein. Im Januar 1946 wechselte ich an das humanistische Gymnasium in Münnernstadt/Unterfranken über. An dieser Anstalt legte ich im Juli 1952 die Reifeprüfung ab.

Mit dem Medizinstudium begann ich im Winter-Semester 1952/53 an der Universität München. Das Physikum habe ich im April 1955 bestanden. Meine klinische Ausbildung erhielt ich ebenfalls in München, wo ich am 23. Juli 1958 das medizinische Staatsexamen bestand.

